

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Entwicklung einer Methode zur Diskriminierung lebender
Salmonella-Enteritidis- und *Salmonella*-Typhimurium-
Impfstämme sowie Etablierung und Evaluierung einer
molekularbiologischen Methode zur raschen Identifizierung von
Salmonella-Serovaren**

von Roman Peter Karl Meyer

aus Starnberg

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Angefertigt am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Oberschleißheim

Mentor: Dr. med. vet. Pia Zimmermann

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferent: Prof. Dr. Cornelia Deeg

Tag der Promotion: 31.01.2015

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Allgemeines.....	3
2	Taxonomie.....	3
3	Biochemische Differenzierung - Anzucht	4
4	Serologische Differenzierung - White-Kauffmann-Le Minor Schema	7
5	Vorkommen.....	9
6	Virulenz.....	11
7	Salmonellen-Infektionen der Tiere.....	12
7.1	Pathogenese	12
7.2	Salmonellen-Infektionen der Haussäugetiere mit adaptierten Erregern.....	13
7.3	Salmonellen-Infektionen des Geflügels	14
8	Salmonellen-Infektionen des Menschen	15
9	Bekämpfungsmöglichkeiten	16
9.1	Impfprophylaxe	18
9.1.1	Immunologie des Impfens	18
9.1.2	Impfung gegen die Salmonellose allgemein	20
9.1.3	Impfung gegen die Salmonellose des Geflügels	22
9.1.3.1	Phänotypische Differenzierung der Geflügelimpfstoffe	22
9.1.3.1.1	Phänotypische Differenzierung der LAH-Impfstämme	23
9.1.3.1.2	Phänotypische Differenzierung der IDT-Impfstämme.....	24
9.1.3.2	Mögliche genetische Grundlagen der phänotypischen Differenzierungsmarker ..	24
9.1.3.2.1	Mögliche genetische Grundlagen der LAH-Impfstämme	24
9.1.3.2.2	Mögliche genetische Grundlagen der IDT-Impfstämme.....	25
10	Molekularbiologische Methoden für die Salmonella-Serovar-Differenzierung ...	26
III	MATERIAL UND METHODEN.....	32
1	Anzucht und Konservierung der <i>Salmonella</i> -Isolate.....	32
2	Verwendete Proben	33
2.1	SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	33
2.2	HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	34
2.3	Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung.....	37
3	DNS-Extraktion.....	39

3.1	Hitzeextraktion für die Multiplex-PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	39
3.2	Extraktion für die Sequenzierungs-PCRs und die HRM-Reaktionen	39
4	Primer	39
5	SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	40
5.1	Prinzipieller Aufbau	40
5.2	Eigene Durchführung der PCR.....	44
6	HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	47
6.1	Konzipierung, Aufbau und Durchführung der HRM-Analyse.....	49
6.1.1	Tests und Anpassungen im Vorfeld	49
6.1.1.1	Anpassung des Protokolls	49
6.1.1.2	Auswahl des Farbstoffes	50
6.1.1.3	Erprobung des optimalen Gesamtvolumens und des Mastermix/Proben-Verhältnisses	51
6.1.2	Durchführung der HRM-Analyse auf dem LightCycler® 480 und dem LightCycler® 96.....	51
6.1.3	Prüfung des Primerpaares FljB-1,2/1,5 für die zusätzliche Differenzierung der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-)	53
6.1.4	Prüfung einer Differenzierungsmethode für die <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2)	53
7	Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung.....	56
7.1	Amplifikation und Probenaufbereitung für die Sequenzierung	56
7.2	Reagenzien für das High Resolution Melting	57
7.3	Differenzierung der LAH-Impfstämme.....	57
7.3.1	Sequenzierung des <i>rpoB</i> -Gens	57
7.3.2	Konzipierung und Auswahl eines Primerpaares für die Differenzierung mittels High Resolution Melting	59
7.3.3	Gerätevergleich	61
7.4	Differenzierung der IDT-Impfstämme	62
7.4.1	Sequenzierung der Gene <i>purA</i> und <i>purB</i>	62
7.4.2	Sequenzierung des <i>his</i> -Genkomplexes.....	63
7.4.3	Konzipierung der Primer für die Differenzierung mittels High Resolution Melting	65
7.4.4	Gerätevergleich	66

IV	ERGEBNISSE	68
1	SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	68
1.1	PCR I	68
1.2	PCR II-G1	69
1.3	PCR II-G3	69
2	HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	72
2.1	Ergebnisse der vorhergegangenen Tests und Anpassungen	72
2.1.1	Farbstoffvergleich	72
2.1.2	Erprobung des optimalen Gesamtvolumens und des Mastermix/Proben-Verhältnisses	76
2.2	Durchführung der HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 mit dem LightCycler® 96	78
2.2.1	Zielgen A	78
2.2.2	Zielgen I	80
2.2.3	Zielgen K	82
2.2.4	Zielgen <i>yohM</i>	84
2.2.5	Zielgen <i>shdA</i>	86
2.2.6	Zielgen CR1	88
2.2.7	Zielgen CR2	90
2.2.8	CR_F CR1_R	92
2.2.9	Vergleich der eigenen Untersuchung mit den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	92
2.2.10	Genauere Betrachtung der Ergebnisse für die Zielgene A, I und K	99
2.2.11	Ergebnis der Prüfung des Primerpaares FljB-1,2/1,5 für die zusätzliche Differenzierung der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-)	102
2.2.12	Ergebnis der Prüfung einer Differenzierungsmethode der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2)	103
2.3	Durchführung der HRM-Analyse mit dem LightCycler® 480	104
3	Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung	110
3.1	LAH-Impfstämme	110
3.1.1	<i>rpoB</i> -Sequenzierung	110
3.1.2	Auswahl des geeignetsten Primerpaares	111
3.1.3	Validierung mit allen Proben	113

3.1.4	Gerätevergleich	114
3.2	IDT-Impfstämme	116
3.2.1	Sequenzierung von <i>purA</i> und <i>purB</i>	116
3.2.2	Sequenzierung des <i>his</i> -Genkomplexes	117
3.2.3	Validierung mit allen Proben	120
3.2.4	Gerätevergleich	122
V	DISKUSSION	125
1	SYBR-Green Multiplex PCR nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	125
2	HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	129
3	Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung	140
VI	ZUSAMMENFASSUNG	148
VII	SUMMARY	150
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	152
IX	ANHANG	167
X	DANKSAGUNG	185

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AMP	Adeninmonophosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bp	Basenpaar(e)
BPLS	Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar
C	Cytosin
Cys	Cystein
°C	Grad Celsius
C _T	cycle threshold
CCR	chemokine receptor
CD4	cluster of differentiation 4
CD8	cluster of differentiation 8
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CXCR	C-X-C chemokine receptor
D	Asparaginsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Guanin
Gly	Glycin
H	Histidin
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HRM	high resolution melting
I	Isoleucin
IFN-γ	Interferon-γ
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IL	Interleukin
IMP	Inosinmonophosphat
K	Lysin
KBE	Koloniebildende Einheit
L	Leucin
M	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHCI	major histocompatibility complex class I
MHCII	major histocompatibility complex class II

MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MIP	macrophage inflammatory protein
MKTTn-Bouillon	Muller Kauffmann Tetrathionat Novobiocin-Bouillon
µl	Mikroliter
MLST	multi locus sequence typing
MLVA	multi locus variable number of tandem repeats analysis
Mm	Mikrometer
mM	Millimolar
N	Asparagin
NRL-Salm	Nationales Referenzlabor zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen)
P	Prolin
PCR	polymerase chain reaction
PEI	Paul Ehrlich Institut
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis
pH	potentia Hydrogenii
PRPP	5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RVS	Rappaport Vassiliadis Bouillon
S	Serin
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SLC	secondary lymphoid tissue chemokine
SNP	single nucleotid polymorphism
ssp.	Subspecies
T	Thymin
Thr	Threonin
Th	T-Helferzellen
TNF- β	Tumor-Nekrose-Faktor- β
TSASB	Trypton-Soya Agar mit Schafsblut
TTSS	Typ III Sekretion System
U	unit
V	Valin
VNTR	variable number tandem repeats
W	Tryptophan
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose Lysin Desoxycholat
Y	Tyrosin

ABBILDUNGSSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Reihenfolge der einzelnen Abschnitte des Histidin (<i>his</i>) Genkomplexes.....	26
Abbildung 2:	Überblick über das ursprüngliche Schema aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	40
Abbildung 3:	Überblick über die jeweiligen Veränderungen innerhalb des <i>oafA</i> Gens	55
Abbildung 4:	Ein <i>Salmonella</i> -Enteritidis-Feldstamm im Vergleich zu den beiden Impfstämmen.....	71
Abbildung 5:	Farbstoffvergleich bei Zielgen A.	73
Abbildung 6:	Farbstoffvergleich bei Zielgen I.....	74
Abbildung 7:	Farbstoffvergleich bei Zielgen K	75
Abbildung 8:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen A	78
Abbildung 9:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen I.....	80
Abbildung 10:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen K	82
Abbildung 11:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen <i>yohM</i>	84
Abbildung 12:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen <i>shdA</i>	86
Abbildung 13:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen CR1	88
Abbildung 14:	Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen CR2.....	90
Abbildung 15:	Vergleich der drei in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten Proben mit Vergleichsstämmen der Serovare <i>Salmonella</i> Glostrup und Hadar.	99
Abbildung 16:	Darstellung der 100 Schmelzkurven als normalisierte Kurven und im Difference Plot für die Zielgene A, I und K.....	100
Abbildung 17:	Amplifikationskurven des Primerpaares FljB-1,2/1,5 in der HRM Analyse	103
Abbildung 18:	Die Schmelzkurven auf dem LightCycler® 480	105
Abbildung 19:	Übersicht der gefundenen SNPs im <i>rpoB</i> Gen.....	110
Abbildung 20:	Vergleich der Aminosäuresequenz die durch das <i>rpoB</i> Gen des LAH <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Impfstammes kodiert wird.....	111
Abbildung 21:	Vergleich der Aminosäuresequenz die durch das <i>rpoB</i> Gen des LAH <i>Salmonella</i> -Enteritidis-Impfstammes kodiert wird	111
Abbildung 22:	Schmelzkurven der fünf unterschiedlichen Primerkombinationen für den RpoB-SNP-Primer.....	112
Abbildung 23:	Schmelzkurven der RpoB-SNP-HRM	113
Abbildung 24:	RpoB-SNP-HRM auf dem LightCycler® 480.	114
Abbildung 25:	RpoB-SNP-HRM auf dem Rotor-Gene Q.....	115

Abbildung 26: Lage der Mutationen der IDT-Impfstämme im <i>his</i> -Genkomplex.	117
Abbildung 27: Vergleich der kompletten Aminosäuresequenz die durch das <i>hisH</i> Gen des IDT <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Impfstammes kodiert wird.....	118
Abbildung 28: Vergleich des durch <i>hisH</i> kodierten Proteins eines Feldstammes sowie des nur teilweise synthetisierten Proteins des Impfstammes.....	118
Abbildung 29: Vergleich der kompletten Aminosäuresequenz die durch das <i>hisB</i> Gen des IDT <i>Salmonella</i> -Enteritidis-Impfstammes kodiert wird	120
Abbildung 30: HRM-Ergebnis für den IDT <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Impfstamm.....	121
Abbildung 31: HRM-Ergebnis für den IDT <i>Salmonella</i> -Enteritidis-Impfstamm.	121
Abbildung 32: Ergebnis auf dem LightCycler® 480 für den IDT <i>Salmonella</i> -Enteritidis- Impfstamm.	122
Abbildung 33: Ergebnis auf dem LightCycler® 480 für den <i>Salmonella</i> -Typhimurium- Impfstamm	123
Abbildung 34: Ergebnis auf dem Rotor-Gene Q für den IDT <i>Salmonella</i> -Typhimurium- Impfstamm	124
Abbildung 35: Ergebnis auf dem Rotor-Gene Q für den IDT <i>Salmonella</i> -Enteritidis- Impfstamm	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Herkunft der 19162 Isolate, welche durch das NRL-Salm im Zeitraum von 2004-2008 untersucht wurden	9
Tabelle 2: Überblick über die zehn, im Zeitraum von 2004-2008 durch das NRL-Salm, am häufigsten isolierten Serovare.....	10
Tabelle 3: Die MHK Werte für die LAH Impfstoffe	24
Tabelle 4: Übersicht für die unterschiedlichen SNP-Klassen	31
Tabelle 5: Überblick über die für die Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendeten Proben	33
Tabelle 6: Übersicht über das Isolationsjahr der Proben die für die SYBR-Green Multiplex PCR nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendet wurden	34
Tabelle 7: Übersicht aller für die HRM nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten <i>Salmonella</i> -Serovare	35
Tabelle 8: Übersicht über das Isolationsjahr der Proben die für die HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	35

Tabelle 9:	Überblick über die im eigenen Versuch und die im Aufbau nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 getesteten Serovare.	36
Tabelle 10:	Übersicht über die Herkunft der verwendeten Proben für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung.....	37
Tabelle 11:	Übersicht über das jeweilige Isolationsjahr der für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung verwendeten Proben.....	37
Tabelle 12:	Überblick über die für die Vergleichsläufe für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung verwendeten Proben.....	38
Tabelle 13:	Überblick der gesamten Ergebnisse aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	42
Tabelle 14:	Übersicht über die in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendeten Primer und Zielgene.....	44
Tabelle 15:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR I.	45
Tabelle 16:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR II-G1... ..	45
Tabelle 17:	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR II-G3... ..	46
Tabelle 18:	Thermoprofil für die drei Multiplex PCRs.....	46
Tabelle 19:	Übersicht über die einzelnen Primerpaare mit ihren jeweiligen Temperaturprofilen und HRM Einstellungen in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	48
Tabelle 20:	Die gewählten Werte für den Melting-Schritt in der HRM nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	49
Tabelle 21:	Überblick über die für die Differenzierung der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante O5-negativ verwendeten Proben.	54
Tabelle 22:	Überblick über die unterschiedlichen Primerkombinationen und die Lokalisation der beiden Primer für die Differenzierung der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante O5-negativ	55
Tabelle 23:	Sequenzen, Produktgrößen und die Position der für die Sequenzierung des <i>rpoB</i> -Gens verwendeten Primer.	58
Tabelle 24:	Thermoprofil für die Sequenzierung des <i>rpoB</i> -Gens	58
Tabelle 25:	Sequenzen, Produktgrößen sowie die Lage auf dem <i>rpoB</i> -Gen für die in der HRM getesteten Primer zur Detektion der beiden <i>rpoB</i> Mutationen.....	59
Tabelle 26:	Thermoprofil für die Austestung der fünf Primerpaare für die RpoB-SNP-HRM	60

Tabelle 27:	Thermoprofil für die HRM-Analyse bei der Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung.	61
Tabelle 28:	Thermoprofil für die Amplifikation der Proben, die für die <i>purA/purB</i> -Sequenzierung verwendet wurden	62
Tabelle 29:	Die für die Sequenzierung des <i>purA</i> - bzw. <i>purB</i> -Gens verwendeten Primersequenzen	63
Tabelle 30:	Thermoprofile der Reaktionen deren Produkte anschließend für die <i>his</i> -Sequenzierung verwendet wurden	64
Tabelle 31:	Die für die Sequenzierung des <i>his</i> -Genkomplexes verwendeten Primersequenzen und die resultierenden Produktgrößen sowie die Lage der Primer im <i>his</i> -Genkomplex.	65
Tabelle 32:	Primersequenzen und Produktgrößen und Positionen der Primer die für den HRM Lauf verwendet wurden um die beiden <i>his</i> -SNPs zu detektieren.	66
Tabelle 33:	Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen, sowie Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR I nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 für die jeweiligen Zielgene	69
Tabelle 34:	Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen, sowie Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR II-G1 nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	69
Tabelle 35:	Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse für Salmonella Typhimurium von 3 Isolaten in der PCR II-G3 nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011	70
Tabelle 36:	Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen, sowie Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR II-G3 nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 für die jeweiligen Zielgene	70
Tabelle 37:	Anpassung des Reaktionsvolumens für die HRM Analysen	77
Tabelle 38:	Gruppenschema für das Zielgen A	79
Tabelle 39:	Gruppenschema für das Zielgen I	81
Tabelle 40:	Gruppenschema für das Zielgen K	83
Tabelle 41:	Gruppenschema für das Zielgen <i>yohM</i>	85
Tabelle 42:	Gruppenschema für das Zielgen <i>shdA</i>	87
Tabelle 43:	Gruppenschema für das Zielgen CR1	89
Tabelle 44:	Gruppenschema für Zielgen CR2	91

Tabelle 45:	Übersicht über die Gruppen aller Zielgene nach der Durchführung der HRM auf dem LightCycler® 96	93
Tabelle 46:	Übersicht über die Gruppen aller Zielgene in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011.	94
Tabelle 47:	Vergleich aller Serovare die sowohl im eigenen Versuchsaufbau als auch in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 getestet wurden	97
Tabelle 48:	Überblick über eine mögliche Differenzierung nur mit den Genen A,I und K.....	101
Tabelle 49:	Stämme die nach den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 nicht anhand der Zielgene A, I und K unterscheidbar sind.....	102
Tabelle 50:	Ergebnis für die Differenzierung der <i>Salmonella</i> -Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2)	104
Tabelle 51:	Überblick über die unterschiedlichen Gruppeneinteilungen der Serovare für die Läufe auf dem LightCycler® 480.....	106
Tabelle 52:	Zielgene A,I,K für die Läufe auf dem LightCycler® 480 bei der HRM Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011	109
Tabelle 53:	Confidence Wert für die RpoB-SNP-HRM auf dem Rotor-Gene Q.....	116

I EINLEITUNG

Salmonellen sind neben *Campylobacter* spp. die wichtigsten Gastroenteritis-Erreger weltweit. Mitglieder des Genus *Salmonella* verursachen beim Menschen und beim Tier eine Vielzahl von Krankheiten. Diese Infektionen können von asymptomatischer Persistenz bis zu gastrointestinalen Infektionen mit fatalem Ausgang reichen. Die Serotypisierung von Salmonellen ist aus infektionsepidemiologischen Gründen äußerst wichtig. Es besteht Meldepflicht im humanmedizinischen Bereich gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG). Die Rindersalmonellose ist eine anzeigepflichtige Tierseuche und, sofern nicht eine Mitteilungspflicht gemäß Geflügel-Salmonellen-Verordnung gegeben ist, sind Salmonellosen der sonstigen Tierarten meldepflichtig. Eine durch bestimmte Serovare (*Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis und *Salmonella* Gallinarum) verursachte Salmonellose beim Geflügel (Hühner und Puten) unterliegt einem EU-weiten Bekämpfungsprogramm und ist mitteilungs-pflichtig. Die klassische Salmonellendiagnostik, basierend auf Voranreicherung, Anzucht und serologischer Typisierung, ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Eine Reduzierung der Zeit durch Verwendung einer schnelleren Typisierungsmethode ist deshalb erstrebenswert. Dadurch könnten notwendige Maßnahmen durch die zuständigen Behörden schneller getroffen werden und damit das Infektionsrisiko für Mensch und Tier reduziert sowie der gesundheitliche Verbraucherschutz gefördert werden.

Für die Anzucht von Salmonellen beim Geflügel bzw. beim Rind ist die Methode gemäß der internationalen Norm DIN EN ISO 6579 gesetzlich vorgeschrieben. Bei der Serovarbestimmung jedoch muss es sich nur um eine geeignete Methode handeln. Bisher wird die Klassifizierung der Salmonellen in Serovare mittels Antigen-Antikörper-Reaktionen nach Kauffmann-White-Le Minor durchgeführt. Diese Methode ist teuer und zeitaufwendig. Daher wäre, insbesondere in Fällen von Geflügelsalmonellose bei denen die Mitteilungspflicht nur für bestimmte Serovare gegeben ist, eine Vereinfachung und Beschleunigung der Serotypisierung erstrebenswert.

Des Weiteren wird in den relevanten Verordnungen bezüglich Geflügelsalmonellose nur der Feldstamm-Nachweis reglementiert. *Salmonella*-Impfstämme hingegen sind explizit ausgenommen und müssen folglich von den Feldstämmen unterschieden werden. Daher sind bei Nachweis von *Salmonella* Typhimurium oder *Salmonella* Enteritidis zwei weitere zeitaufwändige und störanfällige Untersuchungen zur phänotypischen Unterscheidung

notwendig, bevor ein Befund erstellt werden kann. Erst dann können Maßnahmen durch das zuständige Veterinäramt getroffen werden. Immer wieder muss bei widersprüchlichen Ergebnissen die Diagnose durch das BfR bestätigt werden, wodurch sich die Wartezeit bis zum Beginn der Bekämpfungsmaßnahmen wiederum verlängert.

Ziel des Projekts war es folglich eine molekularbiologische Methode zur Unterscheidung von Impf- und Feldstämmen der Serovare *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium zu entwickeln und zu validieren. Daher wurden für die Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung die genetischen Grundlagen der phänotypischen Marker ergründet und anhand dieser eine High Resolution Melt Analysis für die Differenzierung der Impf- und Feldstämme entwickelt. Zudem sollte im Rahmen dieses Projektes versucht werden, die zeit- und kostenintensive Salmonellen-Serotypisierung mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu komplettieren und nach Möglichkeit zu ersetzen. Es wurden daher im Rahmen dieses Projektes zwei publizierte molekularbiologische Methoden zur Salmonellen-Serovar-Differenzierung geprüft, weiterentwickelt und auf ihre Eignung bewertet. Hierbei handelte es sich zum einen um eine Methode mit mehreren Multiplex-PCRs (RAJTAK et al., 2011) und zum anderen um ein High Resolution Melting (HRM) (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011). Die HRM wurde letztlich aufgrund der guten Ergebnisse in weiterentwickelter Form etabliert.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Allgemeines

Salmonellen gehören zur Familie der Enterobacteriaceae. Es handelt sich um fakultativ intrazelluläre (HAESEBROUCK et al., 2004), gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien (MARKS et al., 2011) mit einer Größe von 0,4-0,6 µm x 1-3 µm (SALMONELLA SUBCOMMITTEE, 1934). Die meisten Serovare sind aufgrund ihrer Begeißelung beweglich. Lediglich einige wenige Serovare wie *Salmonella* Gallinarum oder *Salmonella* Pullorum sind strikt unbegeißelt (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005). Zudem sind auch unbewegliche Varianten, der eigentlich als beweglich definierten Serovare (beispielsweise von *Salmonella* Typhimurium) beschrieben (LE HELLO et al., 2012).

2 Taxonomie

Der erste Nachweis eines Salmonellenerregers (*Salmonella* Typhi) erfolgte im Jahre 1880 durch Karl Joseph Eberth, hier jedoch unter dem nach ihm benannten Namen *Eberthella Typhosa*. Vier Jahre später erfolgte die erstmalige Anzucht des Erregers durch Georg Theodor August Gaffky (DARWIN & MILLER, 1999; HAUBRICH, 2012). Die Benennung der Spezies *Salmonella* erfolgte im Jahre 1900 jedoch in Anlehnung an den US-amerikanischen Veterinärmediziner Daniel Elmer Salmon, welcher das Serovar *Salmonella* Choleraesuis als erster beschrieb (KATSCHER, 1997). Seitdem konnten insgesamt 2659 unterschiedliche Serovare beschrieben werden. Diese werden in zwei unterschiedliche Spezies aufgeteilt: *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori*. Eine ebenfalls beschriebene, dritte Spezies *Salmonella subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004) wurde als solche nicht anerkannt und wird folglich auch nicht zum Genus *Salmonella* gezählt (GRIMONT & WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Vor einer wissenschaftlichen Einteilung des Genus *Salmonella* wurden die Subspezies als Subgenera bezeichnet und mit einer römischen Ziffer gekennzeichnet. Diese eigentlich historische, aber dennoch oftmals gebräuchliche Bezeichnungsform ist in der folgenden Beschreibung in Klammern gefasst. Die Spezies *Salmonella enterica* ist unterteilt in sechs Subspezies: *Salmonella* ssp. *enterica* (I), *Salmonella enterica enterica* ssp. *salamae* (II), *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* (IIIa), *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *Salmonella enterica* ssp. *houtenae* (IV) sowie *Salmonella enterica* ssp. *indica* (VI). Auf diese sechs Subspezies, sowie auf die Spezies *Salmonella bongori* (V) verteilen sich die 2659 Serovare folgendermaßen (GRIMONT &

WEILL, 2007; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014):

<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> :	1586	Serovare
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>salamae</i> :	522	Serovare
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i> :	102	Serovare
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i> :	338	Serovare
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> :	76	Serovare
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>indica</i> :	13	Serovare
<i>Salmonella bongori</i> :	22	Serovare

Da der Großteil (99,5 %) der Stämme, die tagtäglich in Laboren identifiziert werden, der Spezies *Salmonella enterica* ssp. *enterica* zugerechnet werden können, wurden einige Serovare dieser Spezies mit Eigennamen versehen. Diese beziehen sich häufig auf den Ort der Erstisolation (z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Dublin), aber auch auf Krankheitssymptome (z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhi) beziehungsweise Krankheitssymptome in Verbindung mit der jeweiligen Wirtsspezies (z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Abortusovis). Für die übrigen Serovare der Spezies *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* erfolgt die genauere Bezeichnung anhand ihrer Antigenformel. Da nur Serovare der Spezies *Salmonella enterica* ssp. *enterica* mit einem Eigennamen versehen wurden, ist es hier üblich von der eigentlich korrekten Schreibweise bei sowohl der Spezies als auch Subspezies (z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhimurium) abzuweichen und lediglich den Eigennamen anzugeben (z.B. *Salmonella* Typhimurium) (GRIMONT & WEILL, 2007).

3 Biochemische Differenzierung - Anzucht

Typische Stoffwechselercheinungen sind die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, die Bildung von H₂S, der Abbau von Propylenglykol sowie die Verwendung von Citrat als einzige Kohlenstoffquelle. Bis auf die *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* und *diarizonae* weisen alle Salmonellen einen fehlenden Laktoseabbau auf (SELBITZ et al., 2011).

Für die Anzucht der Rinder- und Geflügelsalmonellen ist die Anzucht der Salmonellen nach den Vorgaben der DIN ISO 6579, insbesondere in Anhang D – „Nachweis von *Salmonella* spp. in Tierkot und in Umgebungsproben aus der Primärproduktion“, vorgeschrieben. Speziell für die Anreicherung und Voranreicherung der Salmonellen sind hier klare Vorgaben über die zu verwendenden Medien gesetzt. Bei diesen handelt es sich um die folgenden:

- Voranreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser. Hiermit kann eine nicht selektive Voranreicherung durchgeführt werden, falls die Möglichkeit einer Schädigung der Keime durch den Transport oder ähnliche widrige Umstände besteht (PHARMACOPUEIA, 2001).
- Anreicherungsmedium: Modifiziertes halbfestes Medium nach Rappaport-Vassiliadis. Bei diesem Medium handelt es sich um eine Beweglichkeitsanreicherung. Dies bedeutet, dass lediglich bewegliche Salmonellen durch das Medium identifiziert werden. Das Prinzip der Methode beruht auf der Migration der Erreger durch den halbfesten Agar. Die Hemmung der Begleitflora wird durch den Zusatz von Malachitgrün bedingt (DE SMEDT et al., 1991; DE ZUTTER et al., 1991).

Weitere gebräuchliche Anreicherungsmedien die sich in der DIN ISO 6579 (jedoch nicht in Anhang D) wiederfinden, sind:

- Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS): Dieses Medium hemmt das Wachstum anderer Bakterien durch drei Faktoren: Hoher osmotischer Druck, bedingt durch einen hohen Salzgehalt, leicht saurer pH-Wert sowie die Beimengung von Malachitgrün (RAPPAPORT et al., 1956).
- Müller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTTn-Bouillon): In diesem Medium ist Tetrathionat, welches durch Salmonellen reduziert werden kann, beigemischt. Diese Fähigkeit der Reduktion besitzt jedoch auch die Gruppe der *Proteus* Bakterien. Um auch diese selektieren zu können, wurde das Medium durch Zugabe von Novobiocin modifiziert. Somit werden auch die *Proteus* Keime gehemmt (JEFFRIES, 1959).

Da Salmonellen auf Universalnährböden keine spezifischen Merkmale zeigen und somit nicht von den übrigen Keimen differenzierbar sind, müssen für deren Unterscheidung Spezialnährböden verwendet werden. Hier wird in der DIN ISO 6579 (Anhang D) die Verwendung des XLD Agars und eines beliebigen anderen festen Selektivnährbodens vorgegeben. Der XLD Agar sowie die gängigsten sonstigen Selektivnährböden werden im Folgenden, zusammen mit der charakteristischen Stoffwechselreaktion, beschrieben:

- XLD Agar: Dieser Selektivnährboden ist der einzige, dessen Verwendung in der DIN ISO 6579 explizit vorgeschrieben wird. Hierbei handelt es sich um ein Nährmedium, welches vor allem für die Differenzierung der beiden Bakterien *Shigella* und *Salmonella* konzipiert wurde. Die Differenzierung der Salmonellen wird durch den Zusatz von insgesamt drei Stoffen gewährleistet. (1) Natrium-Desoxycholat hat eine unspezifische Wirkung und verhindert das Wachstum grampositiver Keime. (2) Lysin wird durch die Lysin-Decarboxylase der Salmonellen abgebaut. Dies wiederum zieht die Erhöhung des pH-Wertes nach sich und bedingt einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot. Der Nährboden in unmittelbarer Nähe der Kolonien färbt sich daher rosa. (3) Einen weiteren Indikator stellen letztlich noch die Inhaltsstoffe Natriumthiosulfat und Ammonium Eisen (III) Citrat dar. Diese bedingen die Bildung von Schwefelwasserstoff (H_2S), welcher sich als schwarzes Zentrum in den Kolonien manifestiert (TAYLOR, 1965).
- Rambach Agar: Auch hier verhindert Natrium-Desoxycholat das Wachstum grampositiver Keime. Für die Differenzierung wird die Tatsache ausgenutzt, dass *Salmonella* das in diesem Agar enthaltene Propylenglykol abbaut. In Folge dessen entsteht ein saures Milieu, welches wiederum durch einen roten Farbindikator angezeigt wird (RAMBACH, 1990).
- Brilliantgrün-Phenolrot-Agar (BPLS): Auch bei diesem Medium spielt der Farbindikator Phenolrot eine große Rolle. Dieser färbt sich bei saurem pH-Wert gelblich, bei basischem pH-Wert rot bis rosa. Ein saurer pH-Wert kann auf dem Medium nur durch die Spaltung von Laktose oder Saccharose entstehen. Beide Stoffe werden jedoch durch *Salmonella* nicht verarbeitet, so dass hier die Kolonien eine rote Farbe zeigen. Zusätzlich enthält der Nährboden den Zusatz Brilliantgrün, welcher das Wachstum grampositiver Keime hemmt (PHARMACOPUEIA, 2001).
- Gassner Agar: Der Gassner Agar ist ein schwach selektiver Nährboden. Er dient nur zur Abgrenzung zwischen Laktose-negativen und Laktose-positiven Keimen (wie beispielsweise *Escherichia coli*). Da Salmonellen keine Laktose spalten können, zeigen Salmonellenkolonien folglich auf diesem Agar keine Farbreaktion (GASSNER, 1918).
- MacConkey: Auch dieser Agar beruht auf der Unfähigkeit der Salmonellen, Laktose zu spalten. Dies würde durch den enthaltenen Indikator Neutralrot angezeigt werden. Da es bei *Salmonella* jedoch zu keiner Reaktion kommt, bleiben die Kolonien hier farblos (MACCONKEY, 1905).

4 Serologische Differenzierung - White-Kauffmann-Le Minor Schema

Das Schema der serologischen Differenzierung wurde, damals lediglich als „Kauffmann White Schema“ bezeichnet, im Jahre 1934 erstmalig veröffentlicht. Zu diesem Zeitpunkt waren dort nur 44 Serovare erfasst. Über die Jahre wurde es durch das „WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*“ jeweils unter der Führung eines Wissenschaftlers stetig erweitert. So konnte die Zahl auf 958 (Kauffmann), 2267 (Le Minor) bzw. 2555 (Popoff) erhöht werden. Da Le Minor folglich einen Großteil der Serovare hinzugefügt hatte, erfolgte die Umbenennung des Schemas in die heute übliche Bezeichnung „White-Kauffmann-Le Minor Schema“ (SALMONELLA SUBCOMMITTEE, 1934; GRIMONT & WEILL, 2007).

Das Schema beruht hauptsächlich auf der Differenzierung der O- und H-Antigene oder auch, sofern sie vorhanden sind, der Vi-Antigene. Bei den O- und H-Antigenen handelt es sich um Oberflächenantigene, genauer um Polysaccharide (O-Antigene) und Flagellin-Proteine (H-Antigene) (MCQUISTON et al., 2004). Insgesamt umfasst das White-Kauffmann-Le Minor Schema 76 O-Antigengruppen sowie 114 H-Antigene. Diese Oberflächenantigene können durch eine Auswahl spezieller Seren detektiert werden. Jedes Serum enthält Antikörper, welche zu einem oder mehreren der Antigene passen. Wird also das entsprechende Antigen durch die zu prüfende Probe exprimiert, so kommt es zu einer Agglutinationsreaktion und die Probe kann der jeweiligen Antigengruppe zugeordnet werden (MCQUISTON et al., 2004; GRIMONT & WEILL, 2007).

Hierbei wurden die O-Antigengruppen zunächst mit je einem Buchstaben (A-Z) sowie den Ziffern 51-67 gekennzeichnet. Später wurde die Kennzeichnung komplett auf arabische Ziffern geändert (GRIMONT & WEILL, 2007). Ein Serovar kann für mehrere O-Antigene eine positive Reaktion zeigen. Das charakteristischste O-Antigen wird als Hauptantigen bezeichnet und dient der Gruppeneinteilung. In dieser findet sich ebenfalls die alte Bezeichnung in Klammern wieder (Beispiel: Gruppe O 4(B)) (SELBITZ et al., 2011).

Die H-Antigene der meisten Serovare liegen in zwei unterschiedlichen Phasen vor. Hier werden die H-Antigene der ersten Phase (auch spezifische Phase genannt (H1)) mit kleinen lateinischen Buchstaben bezeichnet, die der zweiten Phase (unspezifische Phase (H2)) hingegen mit arabischen Ziffern. Manche Serovare, wie beispielsweise *Salmonella* Dublin, liegen jedoch strikt monophasisch vor und besitzen lediglich eine Phase. Oftmals ist es nicht möglich, beide H-Phasen zur selben Zeit zu bestimmen. Deshalb muss eine weitere Kultivierung unter Zuhilfenahme einer Schwärmplatte erfolgen. Diese wird zunächst mit

dem Antiserum der bereits bestimmten ersten Phase benetzt, um die Ausprägung dieser Phase zu unterdrücken. Hierauf stellt sich, nach entsprechender Bebrütungszeit, die zweite Phase deutlicher dar (*SALMONELLA* SUBCOMMITTEE, 1934; GRIMONT & WEILL, 2007; SELBITZ et al., 2011).

Die Antigen-Formeln aller Salmonellen werden in einem regelmäßig überarbeiteten Schema durch das WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* am Pariser Pasteur-Institut veröffentlicht (GRIMONT & WEILL, 2007). Da die Salmonellen als variabler, lebender Organismus nicht immer alle für das jeweilige Sero var beschriebenen Antigene zeigen oder gar besitzen, musste eine graphische Darstellung für Sonderfälle definiert werden. Daher wurden insgesamt vier Möglichkeiten bestimmt, derartige Abweichungen darzustellen.

Hierzu werden die entsprechenden Antigene durch die Zeichen $_$, $\{ \}$, $[]$ oder $()$ markiert (GRIMONT & WEILL, 2007):

- $_$ = Nur bei O-Antigenen möglich. Das Auftreten dieser Antigene ist abhängig davon, ob eine lysogene Konversion (Transport des entsprechenden Gens durch einen Bakteriophagen (WRIGHT, 1971)) stattgefunden hat oder nicht.

Beispiel: *Salmonella* Isangi: O:6,7,14. Dieses Sero var besitzt immer die beiden O-Antigene 6 und 7. Das O-Antigen 14 hingegen tritt nur nach der lysogenen Konversion auf.

- $\{ \}$ = Ebenfalls nur bei O-Antigenen. Hier werden mindestens zwei Antigene in geschwungenen Klammern angegeben. Diese sind exklusiv, d.h. es kann nur der Inhalt einer Klammer vorkommen.

Beispiel: *Salmonella* Anatum: O:3,{10}{15}{15,34}. *Salmonella* Anatum weist in jedem Fall das O-Antigen 3 auf. Hierzu zeigt das Sero var zusätzlich entweder das O-Antigen 10, das Antigen 15 oder eine Kombination aus 15 und 34.

- $[]$ = Gilt sowohl bei O- als auch bei H-Antigenen. Diese Antigene können vorhanden sein, müssen es jedoch nicht, um einem Sero var zugehörig zu sein. Im Gegensatz zu den mit $_$ gekennzeichneten Antigenen spielt hier eine lysogene Konversion keine Rolle.

Beispiel: *Salmonella* Typhimurium: O:1,4,[5],12. *Salmonella* Typhimurium besitzt in jedem Fall die O-Antigene 4 und 12. Die beiden O-Antigene 1 und 5 können fehlen, ohne dass etwas gegen die Eingruppierung der Probe als *Salmonella* Typhimurium stünde. Wobei hier zu beachten ist, dass das O-Antigen 1 aufgrund lysogener

Konversion variabel ist, wohingegen diese beim O-Antigen 5 keine Rolle spielt.

- () = Auch dieser Fall findet sich bei O- und H-Antigenen. Das entsprechende Antigen ist nur schwach agglutinierbar.

Beispiel: *Salmonella* Surrey H:1,(2),5. Dieses Sero var muss, um als solches definiert werden zu können, für die H-Antigene 1 und 5 eine positive Reaktion zeigen. Das H-Antigen 2 hingegen reagiert hier nur schwach und kann unter Umständen übersehen werden.

Letztlich muss festgehalten werden, dass die Komplexität des Schemas oftmals zu Schwierigkeiten führt. So beträgt die Dauer für die sichere Serotypisierung eines Isolats mindestens drei Tage, da meist mehrere Subkulturen benötigt werden. Bei schwer zu typisierenden Isolaten kann dies jedoch auch mehr Zeit in Anspruch nehmen. Hinzu kommt, dass die Antiseren für seltener auftretende Antigene oftmals nicht kommerziell erhältlich sind oder, falls doch, häufig nur in schwankender Qualität (MCQUISTON et al., 2004).

5 Vorkommen

Das „Nationale Referenzlabor zur Durchführung von Analysen und Tests auf Zoonosen (Salmonellen)“ (NRL-Salm) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) erfasst das Vorkommen von Salmonellen in Umwelt, Futtermitteln, Lebensmitteln und Tieren. Die durch das NRL-Salm veröffentlichten Daten (dargestellt in Tabelle 1) belegen deutlich, dass die Tiere, insbesondere lebensmittelliefernde Tiere, eine große Rolle in der Verbreitung der Salmonellen darstellen.

Tabelle 1: Herkunft der 19162 Isolate, welche durch das NRL-Salm im Zeitraum von 2004-2008 untersucht wurden. Quelle: (FRIEDRICH et al., 2010).

Herkunft	Anteil (%)
Nutztiere	34,2
Lebensmittel	32,6
Heim-, Zoo-, Wildtiere	15,3
Futtermittel	9,5
Umwelt	6,5
Sonstige	1,9

Es zeigt sich, dass der mit 34,2 % größte Teil der in diesem Zeitraum untersuchten 19162 Isolate direkt von Nutztieren stammt. Den zweiten großen Prozentsatz bilden die Lebensmittel (32,6 %). Von diesen wiederum waren 92,6 % tierischen Ursprungs. Zu diesen beiden Gruppen kommen noch die Proben aus dem Bereich Heim-, Zoo-, Wildtiere, sodass hier letztlich 79,7 % aller untersuchten Proben als tierischen Ursprungs definiert werden können. Betrachtet man die direkt vom Tier stammenden Proben genauer, so lässt sich feststellen, dass die 34,2 % der von den Nutztieren stammenden Proben zu fast gleichen Teilen aus Geflügel- (12,9 %), Schwein- (12 %) sowie Rinderproben (8,3 %) (und 1 % Proben von sonstigen Tierarten) stammen. Im Bereich Heim-, Zoo-, Wildtiere wurden insgesamt 2921 (15,3 %) Proben untersucht. Diese verteilten sich gleichmäßig auf die Zootiere (1488 Proben) bzw. Heim- und Wildtiere (1433 Proben). Die erstgenannte Gruppe enthielt hauptsächlich Proben, die von Reptilien stammten (1308 Proben), wohingegen bei den Heim- und Wildtieren die Tauben-Isolate dominierten (861 Proben), gefolgt von Hunde- (197 Proben) und Katzen-Isolaten (113 Proben).

Darüber hinaus muss die Verteilung der einzelnen Serovare betrachtet werden. Tabelle 2 zeigt die zehn am häufigsten isolierten Serovare.

Tabelle 2: Überblick über die zehn, im Zeitraum von 2004-2008, durch das NRL-Salm am häufigsten isolierten Serovare. Quelle: (FRIEDRICH et al., 2010).

Serovar	Anzahl	Anteil (%)
<i>S. Typhimurium</i>	6030	31,5
<i>S. Enteritidis</i>	2031	10,6
<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)	946	4,9
<i>S. Derby</i>	618	3,2
<i>S. Infantis</i>	589	3,1
<i>S. Anatum</i>	476	2,5
1,4,12:d:-	401	2,1
<i>S. Subspezies I, Rauform</i>	400	2,1
<i>S. Paratyphi B</i>	391	2,0
<i>S. Senftenberg</i>	382	2,0

Hier dominieren *Salmonella* Typhimurium (31,5 %, zusammen mit der monophasischen Variante (1,4,[5],12:i:-) sogar 36,4 %) und *Salmonella* Enteritidis (10,6 %) deutlich. Die Dominanz dieser beiden Serovare kann auch bei der Verteilung auf die jeweiligen Tierarten bestätigt werden. Allerdings stehen diese nicht immer im gleichen Verhältnis zueinander. So

zeigt sich beim Geflügel (2481 Proben) eine umgekehrte Situation, da das Serovar mit den meisten Isolaten *Salmonella* Enteritidis (501 Proben), gefolgt von *Salmonella* Typhimurium (313 Proben) ist. Anders stellt sich die Situation wiederum im Fall der Proben vom Schwein dar. Hier findet sich ein deutliches Übergewicht der *Salmonella* Typhimurim Isolate (61,1 %). *Salmonella* Enteritidis hingegen spielt hier nur eine unbedeutende Rolle (1,5 %). Dem Gesamtverhältnis wieder ähnlicher ist die Probenverteilung bei den Rinder-Isolaten. Hier entfallen 46,8 % auf *Salmonella* Typhimurim und 9,9 % auf *Salmonella* Enteritidis. Auch bei den beiden fleischfressenden Haustieren, Hund und Katze, war das Serovar *Salmonella* Typhimurim am häufigsten anzutreffen (78 von 197 Proben bzw. 57 von 113 Proben), gefolgt von *Salmonella* Enteritidis (19 von 197 Proben bzw. 23 Einsendungen von 113 Proben) (FRIEDRICH et al., 2010).

6 Virulenz

Im Gegensatz zu *Escherichia coli* können bei *Salmonella* keine Gruppen mit spezifischen Virulenzeigenschaft eingegrenzt werden. Vielmehr richtet sich die Virulenz nach vier Faktoren, welche sich dann je nach Situation unterschiedlich ausprägen. Bei diesen vier Faktoren handelt es sich um (SELBITZ et al., 2011):

- Adhäsivität
- Invasivität
- Fakultativ intrazellulärer Parasitismus
- Toxinbildung

Hierbei beschreibt die Adhäsivität die Eigenschaft der Salmonellen, sich nach dem Vordringen in das Darmlumen dort am Epithel anzuhaften. Dies wird durch Adhäsine, insbesondere den Fimbrien, bewerkstelligt. Von diesen gibt es unterschiedliche Typen, kodiert durch dazugehörige Gene. Als Beispiele können hier *fim* (Typ I Fimbrien) und *lpf* (long polar fimbriae) genannt werden (BAUMLER, 1997).

Bei den meisten für *Salmonella* beschriebenen Toxinen handelt es sich um Endotoxine, deren Hauptwirkung eine Erhöhung der Sekretion und somit ein entscheidender Beitrag zum klassischen, von Diarrhöe geprägten Krankheitsbild ist (NEENA & ASNANI, 1991; SEARS & KAPER, 1996). Es wird jedoch auch beschrieben, dass diese Endotoxine durch andere Toxine, wie beispielsweise Zytotoxine, unterstützt werden (KOO et al., 1984).

Besonders geeignet für die Invasion sind die M-Zellen. Diese stellen eine gute Eintrittspforte dar, da die Salmonellen das den Zellen eigene Antigen-Transport-System zu ihrem Vorteil modifizieren können (SIEBERS & FINLAY, 1996). Eine Invasion der Enterozyten ist jedoch ebenfalls beschrieben (TAKEUCHI, 1967). Für die Modifizierung der Zelle müssen die Salmonellen Effektorproteine in die Zielzelle einschleusen. Hierzu besitzen die Salmonellen das Typ III Sekretion System (TTSS). Die Gene für dieses befinden sich auf der chromosomalen DNS, genauer auf der so genannten *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1). Das TTSS bildet aus mehreren Proteinen (PrgI, InvG, PrgK und PrgH) einen Injektionsnadelkomplex, durch welchen dann die bakteriellen Proteine in die Zielzelle injiziert werden können (GALÁN, 2001). Nach erfolgreichem Eindringen der Salmonellen in die M-Zellen kommt es zum Tod dieser Zellen und in Folge dessen können die Salmonellen das Darmepithel auf der Seite der Lamina propria überwinden. Dort im Gewebe angekommen, kommt es zum Kontakt mit Zellen des Immunsystems und unter anderem zu den in Kapitel II.9.1.1 beschriebenen Reaktionen (SIEBERS & FINLAY, 1996).

7 Salmonellen-Infektionen der Tiere

7.1 Pathogenese

Die Infektion erfolgt meist über die orale Aufnahme des Erregers. In seltenen Fällen kommt es zu Infektionen über den Respirationstrakt und die Konjunktiven. Meist ist lediglich der Magen-Darm-Trakt von einer Infektion betroffen, es kann aber auch zu extraintestinalen Krankheitsbildern kommen. Das klinische Erscheinungsbild der betroffenen Tiere kann daher sehr unterschiedlich ausfallen. Am häufigsten sind Enteritiden sowie Septikämien zu beobachten, es können aber auch weitere Krankheitsbilder wie Arthritis, Meningitis oder Pneumonie verursacht werden. Besonders wichtig, insbesondere für zur Lebensmittelgewinnung gehaltene Tiere, sind außerdem die Möglichkeiten eines Aborts, von Totgeburten oder auch Kümmerern in Folge einer intrauterinen Infektion des Muttertieres. Des Weiteren kann es auch zur Ausbildung einer klinisch inapparenten Infektion kommen. Diese birgt eine besondere Gefahr, da sie häufig lange unentdeckt bleibt und somit durch die Erregerausscheidung ein Infektionsrisiko für einen ganzen Bestand darstellen kann (BAUER & HÖRMANSDORFER, 1996). Der Hauptfaktor dafür, ob sich eine intra- oder extraintestinale Ausprägung manifestiert, ist die Wirtsadaption. So wird zwischen wirtsadaptierten und nicht adaptierten Salmonellen unterschieden. Wirtsadaptierte Serovare wie *Salmonella* Abortusequi oder *Salmonella* Choleraesuis sind für die entsprechenden Tierarten hoch pathogen und in der Lage, die Darmschleimhaut zu durchdringen. Bei nicht

angepassten Serovaren bleibt die Infektion meist auf den Darm beschränkt (häufige Beispiele hierfür sind Infektionen mit *Salmonella* Typhimurium oder *Salmonella* Enteritidis). Salmonellosen verlaufen, falls es zu einer Septikämie kommt, entweder perakut oder akut; die intestinale Ausprägung hingegen zeigt verschiedene Formen einer Enteritis (akut katarrhalisch, fibrinös oder chronisch) (DAHME & WEISS, 2007).

7.2 Salmonellen-Infektionen der Haussäugetiere mit adaptierten Erregern

Im Folgenden sollen kurz die adaptierten *Salmonella*-Serovare für die jeweiligen Tierarten beschrieben werden.

- Rind: Für das Rind ist besonders *Salmonella* Dublin adaptiert. Dieses verursacht beim Rind die schwersten Erkrankungen, welche ein breites Spektrum wie Durchfall, Bakteriämie oder Arthritis beinhalten können. Auch Todesfälle sind möglich. Die Erkrankung kann perakut, akut, chronisch oder subklinisch verlaufen. Begünstigend für die Vermeidung einer Infektion wirkt sich ein physiologischer Zustand des Pansens aus, da die dort vorkommenden Fettsäuren die Vermehrung der Salmonellen einschränken (NIELSEN, 2013).
- Schwein: Hier kommt den adaptierten Erregern *Salmonella* Choleraesuis und *Salmonella* Typhisuis in Deutschland eher eine historische Rolle zu. Beide Serovare stellten zwar eine große Bedrohung dar, spielen heute jedoch keine Rolle mehr (BAUER & HÖRMANSDORFER, 1996). Salmonellosen werden hier zum mit Abstand größten Teil durch das nicht adaptierte Serovar *Salmonella* Typhimurium verursacht (siehe auch Kapitel II.5).
- Schaf: Charakteristisch für das Schaf ist das an dieses adaptierte Serovar *Salmonella* Abortusovis. Dieses verursacht seiner Bezeichnung entsprechend hauptsächlich Aborte. Ein weiteres mit diesem Serovar assoziiertes Symptom kann aber auch eine erhöhte Lämmersterblichkeit sein. Das Serovar zählt in bestimmten Ländern Europas und West-Asiens zu den Hauptursachen für Aborte beim Schaf (PARDON et al., 1988).
- Pferd: Auch der auf das Pferd adaptierte Erreger *Salmonella* Abortusequi kann bei einer Infektion zum Abort führen. Jedoch gilt hier, ähnlich wie bei den an das Schwein adaptierten Serovaren, dass dieser Erreger, bis auf wenige Einzelfälle, in Europa praktisch nicht mehr vorzufinden ist. Größere Fallzahlen werden jedoch aus Afrika und Asien berichtet (MADIC et al., 1997).
- Hund und Katze: Für die fleischfressenden Haustiere Hund und Katze sind keine

adaptierten Serovare beschrieben. Diese zeigen generell eine erhöhte Resistenz gegenüber Salmonellen-Infektionen (SELBITZ et al., 2011).

7.3 Salmonellen-Infektionen des Geflügels

Von den nicht an das Geflügel adaptierten Serovaren wird *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis die größte Bedeutung beigemessen. Ebenfalls häufig vorkommende Serovare sind unter anderem *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Paratyphi und *Salmonella* Anatum. Eine Besonderheit stellt die Möglichkeit eines vertikalen Übertragungsweges über das infizierte Ei dar. Der Hauptübertragungsweg ist jedoch auch hier die orale Aufnahme der Erreger. Faktoren für die Intensität der Erkrankung sind neben aufgenommener Erregermenge, sekundären Krankheiten und sonstigen Stressoren vor allem das Alter. So kann sich die Infektion bei Küken meist schnell im Darm manifestieren und sich von diesem auch weiter in die inneren Organe ausbreiten. Oft führt hier die Infektion zu klinischen Symptomen, wie erhöhtem Wärmebedürfnis, Müdigkeit, Durchfall, Abmagerung und gesträubtem Gefieder oder gar zum Tod. Bei ausgewachsenen Tieren hingegen kommt es selten zu solchen klinischen Veränderungen. Dies ist hauptsächlich durch die bereits entwickelte Darmflora bedingt. Zwar besiedeln die Salmonellen auch hier den Darm, besonders das Zäkum, führen jedoch selbst bei einer Ausbreitung in die übrigen Organe meist nicht zu klinischen Veränderungen. Infolge dessen werden die erkrankten Tiere zu Dauerausscheidern, die aufgrund der Symptomlosigkeit nur aufgrund von Untersuchungen erkannt werden können.

Spezifisch an das Huhn angepasste Serovare sind *Salmonella* Pullorum und *Salmonella* Gallinarum. Diese Erreger können jedoch auch andere Geflügelarten wie beispielsweise Puten infizieren. Während *Salmonella* Pullorum vor allem bei Küken zu einer Symptomatik führt (ältere Tiere werden meist lediglich zu latent infizierten Dauerausscheidern), verhält es sich bei *Salmonella* Gallinarum umgekehrt: Hier erkranken meist die älteren Tiere. Beide Erkrankungen zeigen einen perakut-septikämischen Verlauf. Die klinischen Veränderungen reichen bei *Salmonella* Pullorum von verminderter Legeleistung (adulte Tiere) bis zu schwerer Allgemeinstörung mit kalkweißem Durchfall, Atemnot und einer Mortalitätsrate von über 50 % (Küken). Das Krankheitsbild von *Salmonella* Gallinarum ist gekennzeichnet durch plötzliche Todesfälle.

Ebenso an das Geflügel, insbesondere die Puten, adaptiert sind die Erreger der Subspezies *Salmonella enterica* ssp. *arizonae*. Hier ist das Krankheitsbild ähnlich der *Salmonella*-Pullorum-Salmonellose. Wie bei dieser bilden nur die Küken eine schwere Symptomatik mit einem gestörten Allgemeinbefinden, blutigem Durchfall oder zentralnervösen Störungen aus.

Die Mortalitätsrate liegt jedoch nur in einem Bereich von 3-15 %. Ältere Tiere werden meist nur latent infiziert und können dann über einen langen Zeitraum als Dauerausscheider fungieren. Symptome bei erwachsenen Tieren können jedoch eine Leistungsminderung oder verminderte Fertilität sein (SIEGMANN & NEUMANN, 2012).

8 Salmonellen-Infektionen des Menschen

Die Infektion erfolgt immer über die orale Aufnahme der Erreger. Über die notwendige Dosis für eine erfolgreiche Salmonellen-Infektion beim Menschen herrschen unterschiedliche Angaben. Im Allgemeinen wird von einer infektiösen Dosis in einem Bereich von 10^5 bis 10^6 Salmonellen (SELBITZ et al., 2011) für einen gesunden Erwachsenen ausgegangen. Manche Studien vermuten jedoch auch die Möglichkeit einer geringeren Dosis ($\leq 10^3$ Salmonellen) (BLASER & NEWMAN, 1982). Hinzu kommt, dass die Dosis allein nicht der einzige Faktor ist, der berücksichtigt werden muss. So spielt die unterschiedliche Wirtsadaptierung der Serovare ebenfalls eine Rolle. Als Beispiele können hier das an das Schwein angepasste Serovar *Salmonella* Choleraesuis oder das an das Rind angepasste Serovar *Salmonella* Dublin genannt werden. Diese verursachen im Verhältnis zu anderen Serovaren häufiger eine Bakteriämie beim Menschen (BLASER & FELDMAN, 1981). Ein weiteres Beispiel für die Unterschiede in der Virulenz der einzelnen Serovare stellt *Salmonella* Pullorum dar. Dieses ist stark an das Geflügel angepasst und muss vom Menschen in sehr hohen Dosen ($\geq 128 \times 10^7$) aufgenommen werden, um zur Erkrankung zu führen (MCCULLOUGH & EISELE, 1951). Aber nicht nur die unterschiedlichen Eigenschaften der Serovare sind variable Faktoren, sondern auch die Verfassung des Wirtes selbst. Hierbei spielen vor allem das Alter (Risikogruppen stellen Kinder unter einem Jahr sowie ältere Personen über 60 Jahren dar) (BLASER & FELDMAN, 1981) sowie der Gesundheitszustand eine wichtige Rolle. So scheinen bestimmte Vorerkrankungen, wie Tumore, Leberschäden, Malaria, Bartonellose, Schistosomiasis oder auch Sichel-Zell-Anämie eine Salmonellen-Infektion zu begünstigen (BENNETT & HOOK, 1959; BLASER & NEWMAN, 1982). Ebenfalls von Bedeutung ist, mit welcher Nahrung die Salmonellen aufgenommen werden. So können beispielsweise besonders fettige Speisen oder Nahrung mit einer hohen Pufferkapazität die Wirkung der Magensäure behindern und somit den Salmonellen die unbeschadete Passage in den Darm erleichtern (BLASER & NEWMAN, 1982).

Die Serovare *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi A, B und C sind an den Menschen adaptierte Serovare und verursachen ihrer Bezeichnung entsprechend den Typhus bzw. Paratyphus. Der Mensch stellt auch gleichzeitig das Erregerreservoir dar. Die Infektion erfolgt

meist durch verunreinigte Lebensmittel oder Wasser. Die Inkubationszeit beträgt 10-14 Tage, danach zeigt sich eine besonders durch Fieber gekennzeichnete Erkrankung, manchmal begleitet durch weitere unspezifische Symptome wie Erbrechen oder Diarrhöe. Daher besteht die Gefahr, die Erkrankung mit einer gewöhnlichen Grippe zu verwechseln. Bei 10-15 % der Patienten kommt es ohne Behandlung zur Ausbildung von schwereren Symptomen. Dies können Darmblutungen, Darmdurchbruch oder Enzephalopathien sein. Das beschriebene klinische Erscheinungsbild gilt sowohl für den Typhus als auch für den Paratyphus, allerdings verläuft der Paratyphus zumeist nur in einer milden Form (BHAN et al., 2005).

Auch für die etwa 2000 Serovaren, die nicht an den Menschen adaptiert sind, ist die Fähigkeit belegt, Krankheitssymptome zu verursachen. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die meisten dieser Serovaren nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen, da der Großteil der Infektionen bei den nicht adaptierten Serovaren nur durch eine Handvoll Serovaren, wie *Salmonella* Typhimurium oder *Salmonella* Enteritidis, verursacht wird. Hierbei kann es sich nicht nur um die als häufigstes Symptom auftretende Enterocolitis handeln, sondern auch um andere Symptomen, wie beispielsweise Bakteriämie oder herdförmige Infektionen. Die Inkubationszeit beträgt hierbei 6 bis 48 Stunden. Das klassische Krankheitsbild ist geprägt von Kopfschmerz, Bauchschmerz, Erbrechen sowie Diarrhöe. Letztere kann Blut oder Mucus beinhalten. Als weitere häufige Symptome können Fieber und Muskelschmerzen auftreten. Die Symptomatik klingt meist innerhalb einer Woche ab, Salmonellen können jedoch weiterhin bis zu einem Zeitraum von 20 Wochen (Kinder unter fünf Jahren) bzw. acht Wochen (Erwachsene) ausgeschieden werden (DARWIN & MILLER, 1999).

9 Bekämpfungsmöglichkeiten

Die erfolgreiche Bekämpfung der Salmonellen sollte auf drei Säulen basieren (SELBITZ et al., 2011):

- Reduktion/ Verhinderung der Salmonellen-Infektionen
- Verringerung des Infektionsdrucks
- Aufbau salmonellenfreier Betriebe

Besonders der Aufbau salmonellenfreier Betriebe stellt eine große Herausforderung für die meisten industrialisierten Nationen dar. Eine Ausnahme hierbei bildet Schweden. Dort ist durch striktes Monitoring sowohl der Lebensmittel liefernden Tiere, als auch deren Futter, die Inzidenz von Salmonellenausbrüchen bedeutend geringer als in den übrigen industrialisierten

Nationen (BOQVIST et al., 2003; WEGENER et al., 2003).

Um gegen die Salmonellen-Infektionen geschlossen vorgehen zu können, sind in der EU und insbesondere in Deutschland eine Vielzahl von Gesetzen in Bezug auf die Salmonellose von Bedeutung. Hier müssen besonders die beiden europäischen Rechtsnormen Richtlinie 2003/99/EG zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern sowie die Verordnung 2160/2003 zur Bekämpfung von Salmonellen und bestimmten anderen durch Lebensmittel übertragbaren Zoonoseerregern genannt werden. Zusätzlich herrscht für beinahe alle Salmonellen-Infektionen Meldepflicht (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten). Ausnahmen bilden lediglich die Rindersalmonellose, hier herrscht sogar Anzeigepflicht (§ 1 Nummer 28 der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen) und die mitteilungspflichtigen Nachweise, welche in § 4 der Geflügel-Salmonellen-Verordnung definiert werden. Letzterer verlangt zum einen die Mitteilung für Hühnerzuchtbetriebe und Hühnerbrütereien bei einem Verdacht von *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (einschließlich der monophasischen Variante 1,4,[5],12:i:-), *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow und *Salmonella* Infantis oder von *Salmonella* Gallinarum, zum anderen ist die Mitteilung für Betreiber eines Aufzuchtbetriebes, eines Legehennenbetriebes, eines Hähnchenmastbetriebes, eines Putenzuchtbetriebes, eines Putenmastbetriebes oder einer Putenbrüterei bei einem Verdacht des Ausbruchs von *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (einschließlich der monophasischen Variante 1,4,[5],12:i:-) oder *Salmonella* Gallinarum vorgeschrieben. In allen Fällen sind in der Geflügel-Salmonellen-Verordnung Impfstämme explizit von der Meldepflicht ausgenommen.

Die wirksamste Prophylaxe stellt die Vakzinierung dar. Hierbei sollte es sich im Idealfall um Lebendvakzine handeln, da durch diese eine Stimulierung zellvermittelter Immunreaktionen gegen die intrazellulär parasitierenden Salmonellen besonders gefördert wird (HAESEBROUCK et al., 2004). Ein weiterer Ansatz zur Prophylaxe zeigt sich in der kompetitiven Exklusion. Hier wird die Darmflora junger Tiere gezielt mit einer aus Hühnerdärmen gewonnenen Flora besiedelt. Diese Flora soll dann schädliche Keime bei der Besiedelung behindern oder diese komplett verhindern (NURMI & RANTALA, 1973). Studien zeigen, dass, insbesondere gegen Infektionen mit *Salmonella* eine Kombination aus Impfung und kompetitiver Exklusion einen besonders guten Schutz darstellen, da hier durch die synergetische Wirkung die Immunantwort bei der Impfung besonders stark ausfällt (METHNER et al., 1999).

9.1 Impfprophylaxe

9.1.1 Immunologie des Impfens

Der erste Kontakt der Antigene (in diesem Fall der Vakzine oder deren Bestandteile) mit den Zellen des Immunsystems findet meist in nicht-lymphatischem Gewebe statt. Die größte Rolle hierbei spielen die im Gewebe befindlichen dendritischen Zellen. Diese durchlaufen nach Kontakt mit einem Antigen drei entscheidende Prozesse: Die Verarbeitung des Antigens, die Wanderung zu den Lymphknoten sowie einen Reifungsprozess.

Für den Prozess der Verarbeitung des Antigens muss unterschieden werden, ob das Antigen sich im extrazellulären Raum oder in der dendritischen Zelle selbst befindet. Im ersten Fall wird es durch Endozytose aufgenommen und in einem lysosomalen Vesikel in Peptide aufgespalten. Diese Peptide werden anschließend auf „major histocompatibility complex class II“ (MHC II) Moleküle geladen. Gebunden an diese werden die Peptide wieder an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert (BEVERLEY, 2002; LENNON-DUMENIL et al., 2002). Anders verhält es sich falls sich das Antigen bereits in der Zelle befindet. Dies kann beispielsweise bei intrazellulären Erregern wie Viren oder anderen Erregern der Fall sein, jedoch auch bei Lebendvakzinen, die einen entsprechenden Erreger enthalten, wie beispielsweise die *Salmonella*-Lebendimpfstoffe (BEVERLEY, 2002; HAESEBROUCK et al., 2004). Zwar werden hier die Antigene durch Proteasomen ebenfalls zu Peptiden abgebaut, diese werden jedoch anschließend in das endoplasmatische Retikulum verbracht. Dort wiederum werden sie auf MHC I Moleküle geladen und ebenfalls zur Zelloberfläche transportiert (KOOPMANN et al., 1997; BEVERLEY, 2002).

Zur selben Zeit wandern die dendritischen Zellen von ihrem Ursprungsgewebe zu den angrenzenden Lymphknoten. Dies wird durch Chemokine und deren entsprechende Rezeptoren vermittelt. Der Mechanismus hierbei ist, dass die dendritischen Zellen im Gewebe Rezeptoren ausbilden (CCR1, CCR5 und CCR6), welche auch für Chemokine empfänglich sind, die durch das Gewebe gebildet werden (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α) und somit die Zellen im Gewebe halten. Diese Rezeptoren werden nun herunter reguliert und es kommt zur vermehrten Ausbildung von Rezeptoren (CXCR4 und CCR7), welche kompatibel zu den Chemokinen der Lymphknoten (SLC und EBV-induced-receptor ligand chemokine) sind. Die dendritischen Zellen können nun diesem Signal folgen und so zu den Lymphknoten gelangen (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; BEVERLEY, 2002; LUSTER, 2002).

Dort angekommen kommt es zu einer Verbindung zwischen den dendritischen Zellen und naiven T-Zellen und in Folge dessen zu einer Aktivierung der T-Zellen. Diese Aktivierung wiederum führt zu einer Differenzierung der T-Zellen zu T-Helferzellen (Th) oder

zytotoxische T-Zellen. Welche der beiden T-Zell-Arten gebildet wird, ist zum einen vom exprimierten MHC Molekül abhängig, zum anderen von den Korezeptoren der T-Zellen. Letztere dienen der Stabilisierung der Bindung zwischen dem MHC/Antigen-Komplex und der T-Zelle. Daher sind nur Verbindungen von MHCI/Antigen-Komplexen mit den zytotoxischen T-Zellen (Korezeptor CD8) sowie die Verbindungen von MHCII/Antigen-Komplexen mit den T-Helferzellen (Korezeptor CD4) möglich. Die Aufgaben der beiden T-Zell-Arten sind grundverschieden. So dienen zytotoxische T-Zellen lediglich dem Zweck intrazellulär infizierte Zellen zu erkennen und diese zu zerstören. Das Aufgabenspektrum der T-Helferzellen hingegen ist weiter gefächert. Diese bilden zwei unterschiedliche Subpopulationen, gesteuert durch die Bildung unterschiedlicher Interleukine (IL), die von den Antigen-präsentierenden Zellen ausgeschüttet werden. Dies sind zum einen IL-12 und IL-18, die eine Umwandlung der Th-Zellen zu Th1-Zellen bewirken sowie IL-4, welches wiederum die Bildung von Th2-Zellen verursacht (TRINCHIERI, 1995; LIU et al., 1998; GRACIE et al., 2003). Beide Th-Zelltypen stimulieren verschiedene Ausprägungen der Immunität. Dies sind die zelluläre Immunität (zytotoxische T-Zellen, Makrophagen), vermittelt durch die Sekretion von IL-2, Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF- β) und Interferon- γ (IFN- γ) durch die Th1-Zellen oder die humorale Immunität (Antikörperbildung) stimuliert durch das IL-4 der Th2-Zellen (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; SELBITZ & MOOS, 2006).

Der Impferfolg selbst geht letztlich durch die Bildung von T-Gedächtniszellen aus. Diese werden sowohl als zytotoxische T-Gedächtniszellen als auch als Helfer-T-Gedächtniszellen angelegt. Entscheidend ist bei diesen, dass sie mehr Korezeptoren ausbilden und somit, im Falle einer Infektion, eine schnellere Aktivierung ermöglicht wird. Dies geht so weit, dass das Antigen nicht mehr von den antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden muss. In Verbindung mit einer erhöhten Langlebigkeit der Zellen stellt dies einen hervorragenden Abwehrmechanismus dar, da die T-Gedächtniszellen somit im Gewebe verweilen können und bei Kontakt mit dem jeweiligen Antigen sofort aktiviert werden (SELBITZ & MOOS, 2006; MARTIN & RESCH, 2009).

9.1.2 Impfung gegen die Salmonellose allgemein

Eine ideale *Salmonella*-Vakzine sollte die folgenden Ereignisse verhindern (HAESEBROUCK et al., 2004):

- Besiedelung des Wirts
- Ausscheidung der Erreger in die Umwelt
- Ausbildung latent infizierter Ausscheider
- Ausbildung der klinischen Salmonellosen

Diese Ziele scheinen jedoch aufgrund des hohen Infektionsdrucks unter den gegebenen Umständen in der Tierproduktion nicht realisierbar. Vielmehr ist die Impfung als eine Unterstützung zu anderen Methoden, wie beispielsweise Futterzusätze (Prä- und Probiotika), zu sehen. Daher sollten die Anforderungen für eine erfolgreiche Vakzinierung in der aktuellen Situation wie folgt beschrieben werden:

- Reduzierung der Ausscheidung von Erregern
- Stärkung der körpereigenen Abwehr, damit eine höhere Infektionsdosis für eine erfolgreiche Infektion benötigt wird
- Verhinderung der Ausbildung klinischer Symptome

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, kommen für die Abwehr pathogener Bakterien im Wirtsorganismus sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort zum Zuge. Hier kann die Aussage getroffen werden, dass extrazelluläre Maßnahmen, wie beispielsweise Antikörper, nur effektiv gegen Erreger sind, die sich nicht im intrazellulären Raum befinden, da diese dort nicht erreichbar sind und sich ungehindert vermehren können. Dennoch spielen extrazelluläre Mechanismen auch bei der Bekämpfung der intrazellulären Erreger eine bedeutende Rolle, da sich die Erreger, insbesondere die fakultativ intrazellulären, meist nicht dauerhaft im intrazellulären Raum befinden, sondern diesen im Laufe des Infektionszyklus verlassen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Lyse der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten, um die Erreger für extrazelluläre Bekämpfungsmöglichkeiten zugänglich zu machen.

Weil es sich bei *Salmonella* um fakultativ intrazelluläre Erreger handelt, sind diese Mechanismen für die Impfprophylaxe von besonderer Bedeutung. Es bedarf folglich einer Vakzine, welche zum einen die Ausbildung passender zytotoxischer T-Lymphozyten bewirkt

und zudem die zelluläre Immunantwort verstärkt stimuliert (HAESEBROUCK et al., 2004; SELBITZ & MOOS, 2006).

Für die Salmonellose-Impfung sind sowohl Tot- als auch Lebendimpfstoffe für verschiedene Tierarten zugelassen. Diese werden auf der Homepage der hierfür zuständigen Behörde, dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI, www.pei.de), veröffentlicht. Das erwähnte Anforderungsprofil erfüllen jedoch nur die Lebendvakzine, da sich die im Impfstoff enthaltenen Salmonellen ebenso wie pathogene Salmonellen in den intrazellulären Raum zurückziehen und somit die entsprechenden Reaktionen gegen intrazelluläre Erreger, insbesondere die Bildung von zytotoxischen T-Zellen und deren Gedächtniszellen, verursachen. Hinzu kommt, dass die Bakterien der Lebendvakzine länger im Organismus persistieren als die Bestandteile der inaktivierten Vakzine und somit einen stärkeren Stimulus zur Folge haben. Totimpfstoffe hingegen bewirken meist nur eine Immunantwort der T-Helferzellen. Sofern zuvor jedoch keine entsprechenden zytotoxischen T-Zellen gebildet wurden, ist diese gegen Salmonellen im intrazellulären Raum ohne Wirkung (HAESEBROUCK et al., 2004; SELBITZ & MOOS, 2006).

Folglich sind hier also die Lebendvakzine, sofern diese für die Tierart zugelassen sind, vorzuziehen, es sei denn, eine Vermehrung im Tier wäre aus nicht den Impferfolg betreffenden Gründen unerwünscht. Hergestellt werden die Lebendimpfstoffe in klassischer Weise durch Bestrahlung mit UV-Licht oder Passagierung mit Chemikalien, wodurch eine Mutagenese induziert wird. Diese wiederum sollen zu Mutationen in für die Salmonellen wichtigen Genen führen und die Erreger auf diesem Weg attenuieren. Bei moderneren Methoden werden gezielt mutierte Gene in das Salmonellen-Genom eingebracht. Die Attenuierung bedeutet eine entscheidende Schwächung der Salmonellen in ihrer Robustheit. Somit verhalten sich die Impfstämme zwar wie die nicht attenuierten Keime und induzieren die entsprechenden Immunreaktionen, können aber auch leicht durch das Immunsystem des Körpers unschädlich gemacht werden (CHATFIELD et al., 1993).

Trotz der Entwicklung anderer, neuer *Salmonella*-Lebendimpfstämme (TENNANT et al., 2011) sind in Deutschland derzeit lediglich vier *Salmonella*-Lebendimpfstämme zugelassen (Stand Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 397 vom 08.06.2014, Fundstelle BAnz AT 27.08.2014 B7, Quelle: www.pei.de). Hierbei handelt es sich um je einen *Salmonella*-Typhimurium- und einen *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm der Firmen Lohmann Animal Health (Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven) sowie IDT Biologika (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau). Diese Impfstämme finden in unterschiedlichen zugelassenen Vakzinen Verwendung. Es herrschen jedoch tierartspezifische Unterschiede bei

der Zulassung. So sind für das Geflügel verschiedene Vakzine, die insgesamt alle vier möglichen Lebendimpfstämme enthalten, zugelassen. Im Fall der Rinder und Schweine sind nur Vakzine mit den IDT-Impfstämmen erhältlich. Für die übrigen Tierarten sind keine Vakzine zugelassen (www.pei.de). Zu beachten ist außerdem, dass eine Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung nur für die Salmonellosen des Geflügels gesetzlich vorgeschrieben ist (Geflügel-Salmonellen-Verordnung), für die Salmonellosen der Rinder und Schweine ist dies nicht der Fall.

9.1.3 Impfung gegen die Salmonellose des Geflügels

Bei der Impfung des Geflügels handelt es sich ausschließlich um Bestandsimpfungen. Als Untersuchungszeitpunkte empfiehlt sich die Zeit vor der Grundimmunisierung und der Nachimpfung sowie bei Legehennen während der Legeperioden.

In Deutschland sind beim Geflügel Impfstoffe für Hühner, Tauben, Puten und Enten zugelassen. Zugelassen sind lediglich Impfstoffe, die auf Basis der Serovare *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium hergestellt wurden. Die früher ebenfalls erhältliche Impfung mit einem *Salmonella*-Gallinarum-Lebendimpfstamm (KANG et al., 2012) ist verboten. Dieses Verbot sowie weitere rechtliche Angaben bezogen auf die Vakzinierung des Geflügels finden sich in der Geflügel-Salmonellen-Verordnung. Weitere Vorschriften bezüglich der Impfung sind zum einen die dort vorgeschriebene Impfpflicht für Hühneraufzuchtbetriebe gegen *Salmonella* Enteritidis sowie Möglichkeiten der Behörden, Impfmaßnahmen anzuordnen. In der Geflügel-Salmonellen-Verordnung ebenfalls festgelegt ist, dass bei einer diagnostischen Feststellung der Serovare *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Virchow sowie *Salmonella* Infantis ausgeschlossen werden muss, dass es sich um einen Impfstamm handelt. Da jedoch nur Vakzine für die Serovare *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis zugelassen sind (www.pei.de), findet diese Differenzierung lediglich bei diesen beiden Serovaren statt.

9.1.3.1 Phänotypische Differenzierung der Geflügelimpfstoffe

Für die gesetzlich vorgeschriebene Differenzierung der Geflügelimpfstoffe stellen die beiden Hersteller der Lebendvakzine je ein System zur Verfügung. Dies sind die Avipro[®] Plate (Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven) sowie das IDT *Salmonella* Diagnostikum (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau). Beide Systeme beruhen auf einer phänotypischen Differenzierung. Hierbei handelt es sich jedoch um unterschiedliche Merkmale. So zeigen die Impfstämme der Firma Lohmann (LAH) ein charakteristisches Resistenzschema in der mit unterschiedlichen Antibiotika beimpften 96-Loch-Platte. Die

Impfstämme der Firma IDT Biologika (IDT) hingegen sind auxotroph. Dies bedeutet, sie können bestimmte Stoffe nicht selbst herstellen. Diese Stoffe müssen ihnen extern zugeführt werden (MAUDER & RAU, 2014).

9.1.3.1.1 Phänotypische Differenzierung der LAH-Impfstämme

Die LAH-Impfstämme sind in den beiden Vakzinen AviPro *SALMONELLA* VAC E (*Salmonella* Enteritidis), AviPro *SALMONELLA* VAC T (*Salmonella* Typhimurium) sowie in dem Kombinationsimpfstoff AviPro *SALMONELLA* DUO (beide Impfstämme) enthalten (Stand Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 397 vom 08.06.2014, Fundstelle BAnz AT 27.08.2014 B7, Quelle: www.pei.de).

Einen genauen Überblick über die jeweiligen phänotypischen Marker bietet die Gebrauchsanleitung der Avipro®Plate (Avipro®Plate Instruction Manual Version 7.0, March 2012). Beide Impfstämme sind resistent gegenüber Rifampicin. Zusätzlich zeigt der *Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm eine Resistenz gegenüber Nalidixinsäure sowie eine Reversion der Tensidtoleranz („reversion to tenside tolerance“ kurz „rtt“). Der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm hingegen zeigt, neben der bereits erwähnten Rifampicin-Resistenz, eine Resistenz gegenüber Streptomycin sowie eine Supersensitivität gegenüber Quinolonen („supersensitivity to quinolones“ kurz „ssq“). Eine weitere gemeinsame Besonderheit der Impfstämme ist eine weniger hohe Resistenz gegenüber Erythromycin als die Feldisolate.

Entsprechend dieser Eigenschaften werden sie mit den Kürzeln Nal2/Rif9/Rtt, sowie Sm24/Rif12/Ssq versehen.

Dieses Resistenzschema wird auch bei der Differenzierungsmethode des Herstellers ausgenutzt. Hierbei wird jede Kammer einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit dem zu prüfenden Keim beimpft und für 18 bis 24 Stunden bebrütet. In den Vertiefungen der Platte befinden sich unterschiedliche Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen. Hierdurch zeigen sich nach der Bebrütung die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) und somit auch die Resistenzen des Keimes für die jeweiligen Antibiotika. Zu beachten ist, dass obwohl die Platte eine Vielzahl von Antibiotika abdeckt, dennoch für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung nur die oben genannten Antibiotika Rifampicin, Erythromycin und Streptomycin benutzt werden. Eine Darstellung der für die Differenzierung relevanten MHK Werte bietet die Tabelle 3.

Tabelle 3: Die aus der Anleitung des Herstellers entnommenen MHK Werte für die beiden LAH-Impfstoffe im Vergleich zu einem Feldstamm. Quelle: Avipro®Plate Instruction Manual Version 7.0, March 2012

Stamm	Antibiotikum	MHK (µg/ml)
S.-Enteritidis-Impfstamm (Sm24/Rif12/Ssq)	Erythromycin	< 20
S.-Typhimurium-Impfstamm (Nal2/Rif9/Rtt)	Erythromycin	< 20
Feldstamm (S. Enteritidis)	Erythromycin	≥ 30
S.-Enteritidis-Impfstamm (Sm24/Rif12/Ssq)	Rifampicin	> 50
S.-Typhimurium-Impfstamm (Nal2/Rif9/Rtt)	Rifampicin	> 50
Feldstamm (S. Enteritidis)	Rifampicin	< 50
S.-Enteritidis-Impfstamm (Sm24/Rif12/Ssq)	Streptomycin	> 200
Feldstamm (S. Enteritidis)	Streptomycin	< 200

9.1.3.1.2 Phänotypische Differenzierung der IDT-Impfstämme

Die IDT-Impfstämme werden in einer Vielzahl zugelassener Vakzine verwendet (*Salmonella* Enteritidis: Salmovac SE, Gallivac SE; *Salmonella* Typhimurium: Salmoporc, Zoosaloral H, Zoosal T, Chevivac-S) (Stand Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 397 vom 08.06.2014, Fundstelle BAnz AT 27.08.2014 B7, Quelle: www.pei.de).

Im Gegensatz zu den LAH-Impfstämmen handelt es sich bei den IDT-Impfstämmen im Falle des phänotypischen Markers, wie bereits erwähnt, nicht um Resistenzen, sondern um Auxotrophien, im Speziellen um eine Histidin- und Adenin-Auxotrophie. Dies gilt sowohl für den *Salmonella*-Typhimurium-, als auch für den *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm. Die Differenzierung beruht daher auf zwei getrennten Medien, von denen eines die benötigten Stoffe enthält (Medium B), das andere hingegen nicht (Medium A). Beide Medien werden gleichzeitig beimpft und für 18 bis 48 Stunden inkubiert. Daraufhin zeigt sich ein charakteristisches Ergebnis in den beiden Medien. Entsprechend der Inhaltsstoffe ist dies im Falle der Impfstämme ein Wachstum in Medium B und kein Wachstum in Medium A (IDT *Salmonella* Diagnostikum Gebrauchsanleitung Stand 07/08).

9.1.3.2 Mögliche genetische Grundlagen der phänotypischen Differenzierungsmarker

9.1.3.2.1 Mögliche genetische Grundlagen der LAH-Impfstämme

Wie in Kapitel II.9.1.3.1.1 bereits beschrieben, sind die für beide Impfstämme gemeinsamen Eigenschaften die Resistenz gegenüber Rifampicin und die weniger hohe Resistenz gegenüber Erythromycin im Vergleich zu den Feldisolaten.

Für die Erythromycin-Resistenz sind in der Literatur eine große Anzahl von unterschiedlichen Mechanismen beschrieben, die jeweils eine andere genetische Grundlage besitzen. Dies sind beispielsweise Mutationen der 23S-RNA (VESTER & DOUTHWAITE, 2001) oder der ribosomalen Proteine L4 und L22 der 50S Untereinheit des *Escherichia coli* Ribosoms (CHITTUM & CHAMPNEY, 1994; LOVMAR et al., 2009).

Im Gegensatz dazu ist die Rifampicin-Resistenz sehr gut beschrieben und als gemeinsamer Marker beider Impfstämme für eine gemeinsame Differenzierung gut geeignet. Verschiedene Quellen zeigen für unterschiedlichste Erreger wie *Escherichia coli* (OVCHINNIKOV et al., 1981a; 1981b; 1983; LISITSYN et al., 1984; JIN & GROSS, 1988), *Streptomyces lividans* (HU et al., 2002) oder *Staphylococcus aureus* (WICHELHAUS et al., 1999), dass die Grundlage der Rifampicin-Resistenz durch Mutationen des *rpoB*-Gens begründet ist. Alle genannten Publikationen zeigten, dass bereits ein einzelner Basenaustausch zu einer Rifampicin-Resistenz führen kann. Ebenso wurde aufgezeigt, dass diese Mutationen auf enge Bereiche (WICHELHAUS et al., 1999) oder sogar auf eine geringe Anzahl möglicher Punkte (OVCHINNIKOV et al., 1981a; 1981b; 1983; LISITSYN et al., 1984; JIN & GROSS, 1988) des *rpoB*-Gens beschränkt sind.

9.1.3.2.2 Mögliche genetische Grundlagen der IDT-Impfstämme

Hier werden beide Impfstämme durch die Adenin- und Histidin-Auxotrophie unterschieden.

Die Synthese von Adenin besteht aus einer langen Kette von aufeinander folgenden Reaktionen. Von diesen sind jedoch nur die letzten beiden Schritte ausschließlich für die Synthese von Adenin verantwortlich (VOET & VOET, 2011). In diesen letzten beiden Schritten wird Inosinmonophosphat (IMP) zunächst zu Adenylsuccinat und anschließend zu Adeninmonophosphat (AMP) umgewandelt. Verantwortlich für diese beiden Umwandlungsschritte sind die Enzyme Adenylsuccinatsynthetase und Adenylsuccinatlyase. Diese beiden Enzyme wiederum liegen in den Genen *purA* und *purB* kodiert, welche auch als möglicher Sitz einer Adenin-Auxotrophie beschrieben werden (MORMANN et al., 2006). Eindeutig zeigt sich die genetische Grundlage im Fall von Histidin. Dieses wird durch insgesamt 9 Enzyme gebildet, welche Schritt für Schritt 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (PRPP) zu Histidin umwandeln. Es wird beschrieben, dass sich jedes der entsprechenden Gene nacheinander aufgereiht auf dem DNS-Strang befindet (JULIAO et al., 2007). Diese Genorte werden in ihrer Reihenfolge auf der DNS *hisG*, *hisD*, *hisC*, *hisB*, *hisH*, *hisA*, *hisF*, *hisI* genannt (siehe Abbildung 1).

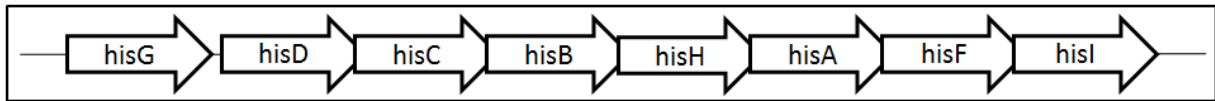


Abbildung 1: Reihenfolge der einzelnen Abschnitte des Histidin (*his*) Genkomplexes.

10 Molekularbiologische Methoden für die *Salmonella*-Serovar-Differenzierung

Aufgrund des hohen Arbeits- und Zeitaufwands, den die klassische Serovardifferenzierung (siehe Kapitel II.4) in Anspruch nimmt, erscheinen molekularbiologische Methoden als geeignetes Mittel, um diese zumindest zu komplettieren oder nach Möglichkeit zu ersetzen. Hierzu wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt und geprüft. Unter anderem finden sich Publikationen über folgende Methoden:

- Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR): Die PCR wird verwendet, um in kurzer Zeit eine spezifische DNS/RNS-Zielsequenz so zu vervielfältigen, dass diese danach in nachweisbaren Mengen vorliegt. Das Prinzip der PCR beruht auf drei repetitiven Schritten. Dies sind das Annealing, die Denaturierung sowie die Elongation. Im ersten Schritt, dem Annealing, lagert sich je ein Oligonukleotid-Primer an eine Stelle eines DNS-Stranges. Hierauf erfolgt durch die Erhöhung der Temperatur eine Denaturierung der DNS, welche in Folge dessen zu einem Einzelstrang aufgeteilt wird. Nun wird die Temperatur wieder leicht gesenkt und die Polymerasen können, ausgehend von den Primern, an beiden DNS-Strängen das entsprechende Komplementärstück bilden. Dieser Vorgang wird mehrmals (gebräuchlich sind 30-40 Zyklen) wiederholt, so dass, durch exponentielles Wachstum, eine große Menge der anvisierten Ziel-DNS gebildet wird (ERLICH et al., 1991). Diese Methode reicht von einfachen Singleplex-PCRs bei der nur ein einzelnes Primerpaar verwendet wird (RIBEIRO et al., 2009) bis zu konventionellen (HERRERA-LEON et al., 2007; MARTINEZ-BALLESTEROS et al., 2012) oder real-time basierten (RAJTAK et al., 2011) Multiplex-PCRs, bei welchen die Reaktionen mit mehreren Primerpaaren gleichzeitig durchgeführt werden. Hierbei besitzen die Singleplex-PCRs nur geringes diskriminatorisches Potential. Diese können aber beispielweise für eine Differenzierung zweierlei unterschiedlicher Serovare verwendet werden (RIBEIRO et al., 2009). Geeigneter für eine Charakterisierung mehrerer Serovare ist die Verwendung einer Multiplex-PCR, bei

der mehrere Primerpaare gleichzeitig geprüft werden. Somit kann unter Verwendung einer Multiplex-PCR zumindest das Genus *Salmonella* detektiert und in geringem Umfang auch die Serovare genauer beschrieben werden (MARTINEZ-BALLESTEROS et al., 2012). Die Kombination mehrerer Multiplex-PCRs bietet das Potential, ein serovarspezifisches Profil anhand der entstanden Produkte zu erhalten, mit dem eine Serotypisierung zahlreicher Serovare möglich ist. Hierfür ist die Publikation von Herrera-Leon et al. aus dem Jahr 2007 ein gutes Beispiel. Dort wurden durch die Kombination von drei Multiplex-PCRs von den 500 geprüften Proben 84,6 % dem richtigen Serovar zugeordnet. Ein ähnlicher Ansatz wurde in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verfolgt. Auch hier entstand durch die Kombination dreier Multiplex-PCRs eine potente Differenzierungsmethode, die zusätzlich den Vorteil einer real-time PCR und somit einer erheblichen Zeitersparnis im Vergleich zu den konventionellen Ansätzen mit sich bringt.

- Microarray: Der Aufbau dieser Methode besteht aus einer Vielzahl einzelner Bereiche. In jedem dieser Bereiche befindet sich eine spezifische DNS Sequenz, welche bei Bindung an einen komplementären Strang durch den ebenfalls anwesenden Farbstoff eine Fluoreszenzreaktion zeigt. Hierdurch können zur gleichen Zeit eine Vielzahl unterschiedlicher Genabschnitte untersucht werden (HELLER, 2002). Für diese Methode wurden verschiedene Publikationen über mögliche Serovar-Differenzierungen veröffentlicht (PORWOLLIK et al., 2004; SCARIA et al., 2008). Diese Publikationen konnten die dort geprüften 27 (PORWOLLIK et al., 2004) beziehungsweise 14 (SCARIA et al., 2008) Serovare eindeutig identifizieren. Jedoch zeigte sich in beiden Publikationen, dass es hierbei oft zu einer gemeinsamen Gruppierung verschiedener Serovare in die gleiche Gruppe kommt. Dies wiederum liegt darin begründet, dass die Methode sehr viele unterschiedliche Gene überprüft, welche über die in der klassischen Serotypisierung verwendeten Gene hinausreichen. Es kommt somit eher zu einer Genovar Bestimmung als zu einer Serovar-Differenzierung.
- Multilocus Sequenz Typisierung (Multi Locus Sequence Typing, MLST): Bei dieser Methode werden Unterschiede in mehreren Genen analysiert. Bei diesen Genen handelt es sich meist um organisatorische Gene (Haushalts-Gene bzw. housekeeping genes). Speziell für die Differenzierung der Salmonellen bieten sich jedoch auch die Verwendung von Virulenzgenen an, da diese oftmals serovarspezifische Unterschiede

zeigen (KOTETISHVILI et al., 2002; SUKHNANAND et al., 2005; TANKOUO-SANDJONG et al., 2007). So konnten in der Publikation von Tankouo-Sandjong et al. aus dem Jahr 2007 unter Verwendung je zweier Haushalts- und Flagellin-Gene alle Subspezies und 22 unterschiedliche Serovare differenziert werden. In der Publikation von Sukhnanand et al. aus dem Jahr 2005 wurden 25 Proben verteilt auf fünf Serotypen geprüft. Diese 25 Proben wurden acht MLST-Typen zugeordnet, welche wiederum bis auf eine Probe den Serotypen entsprachen. Ein Vergleich zu der Methode der Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) zeigte ein höheres diskriminatorisches Potential für die MLST (KOTETISHVILI et al., 2002).

- Multi Locus VNTR Analyse (Multi Locus Variable Number Of Tandem Repeats Analysis, MLVA): Bei der MLVA werden polymorphe Regionen, welche durch sich wiederholende Sequenzen gekennzeichnet sind (so genannte Variable Number Tandem Repeats, VNTRs), untersucht. Die Methode wird jedoch eher für Ausbruchsanalysen von nur einem einzelnen Serovar verwendet (BOXRUD et al., 2007; TORPDAHL et al., 2007; DIMOVSKI et al., 2014). So diene beispielsweise die Methode für eine Untersuchung von 203 *Salmonella* Typhimurium Isolaten aus zusammenhängenden Ausbrüchen (DIMOVSKI et al., 2014). Im Vergleich zu der ebenfalls für die genauere Erforschung von *Salmonella* Ausbrüchen genutzte Methode der PFGE zeigte die MLVA bessere Resultate (BOXRUD et al., 2007; TORPDAHL et al., 2007).
- Pulsfeld-Gelelektrophorese (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE): Diese Methode beruht, wie die Agarose-Gelelektrophorese, auf der Auftrennung unterschiedlicher DNS Stränge nach ihrer Größe. Hierzu werden, bei beiden Methoden, die zu untersuchenden DNS-Fragmente in ein Agarose-Gel gegeben und eine Spannung angelegt. Hierauf bewegen sich die Fragmente, entsprechend ihrer Größe, unterschiedlich schnell durch das Gel. Der entscheidende Unterschied beider Methoden liegt darin, dass bei der PFGE die Richtung der Spannung nach einem festgelegten Schema gewechselt wird und somit ein spezifisches Muster entsteht (TENOVER et al., 1995). PFGE stellt den derzeitigen Standard für die Subtypisierung von pathogenen, bakteriellen Erregern aus Lebensmitteln dar und wird ebenfalls, wie die MLVA, oftmals für die Untersuchung von Ausbrüchen und Infektketten eingesetzt (BOXRUD et al., 2007; PANG et al., 2007; TORPDAHL et al., 2007). Ein Beispiel ist die Publikation von Pang et al. aus dem Jahr 2007 in der eine Verbindung von

Salmonella Enteritidis Isolat aus Deutschland und Taiwan gezogen wurde.

Jedoch konnten all diese Ansätze die klassische Serotypisierung nur komplementieren und nicht völlig ersetzen (ARRACH et al., 2008). Dennoch werden kontinuierlich neue Ansätze erforscht. So wurde im November 2011 ein weiterer vielversprechender Ansatz in Form einer High Resolution Melt Analysis (HRM) vorgestellt (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011). Diese soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Die High Resolution Melt Analysis (HRM) ist eine verfeinerte Form einer Schmelzkurvenanalyse. Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse beruht auf einer kontinuierlichen Erhöhung der Temperatur und in Folge dessen einer Auftrennung des DNS-Stranges. Dies geschieht in der Regel an einem für die jeweilige DNS spezifischen Punkt, dem so genannten Schmelzpunkt. Somit kann bereits nur durch den Schmelzpunkt eine spezifische Aussage für die jeweilige DNS getroffen werden. Nun hebt sich die HRM von einer gewöhnlichen Schmelzkurvenanalyse in der Form ab, dass hier der Temperaturanstieg in wesentlich feineren Schritten durchgeführt und detektiert werden kann. Somit kann hier nicht nur der Punkt bestimmt werden, an dem sich der gesamte Strang auflöst (Schmelzpunkt), sondern auch kleinere Unterschiede beziehungsweise eine Auftrennung des Stranges Stück für Stück dargestellt werden.

Generell stützt sich die Methode auf die unterschiedliche Bindungsstärke der DNS-Stränge. Diese ist abhängig von der Zusammensetzung des jeweiligen DNS-Stückes. Die Unterschiede in der Bindungsstärke entstehen durch die Länge des untersuchten Fragments sowie dem Gehalt an Guanin-Cytosin (GC)- bzw. Adenin-Thymin (AT)-Bindungen. Dies ist dadurch bedingt, dass die Basenpaarung von Guanin und Cytosin durch drei Wasserstoffbrückenbindungen aufrechterhalten wird, wo hingegen Adenin und Thymin lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Folglich sind Fragmente mit einem höheren GC-Gehalt stabiler und haben eine höhere Schmelztemperatur (REED et al., 2007; DRUML & CICHNA-MARKL, 2014).

Ein weiterer wichtiger Faktor für jede Schmelzkurvenanalyse ist der Farbstoff, der in den DNS-Doppelstrang eingelagert wird. Für die klassische Schmelzkurvenanalyse wird hier meist SYBR Green verwendet, für die HRM hingegen herrscht Uneinigkeit, ob dieser Farbstoff ausreichend ist. So zeigten manche Studien schlechte Ergebnisse für SYBR Green. Dies wurde dadurch begründet, dass SYBR Green zu hoch dosiert werden muss, um den DNS-Strang zu sättigen und dann in dieser hohen Konzentration den Ablauf der PCR behindert (WITTEWERT et al., 2003; REED et al., 2007). Andere Studien widersprechen dem und zeigen gute Ergebnisse für SYBR Green (PRICE et al., 2007; PORNPRASERT et al.,

2011). Dennoch werden meist die moderneren sättigenden Farbstoffe wie SYTO9 oder ResoLight für publizierte HRM-Analysen verwendet.

Das gemeinsame Wirkprinzip dieser Farbstoffe ist, dass sie sich im Laufe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an die Doppelstrang-DNS binden. Nur eingelagerter Farbstoff ist stark fluoreszierend. Bei einer schrittweisen Anhebung der Temperatur wird die DNS nach und nach zu Einzelsträngen aufgespalten, der Farbstoff löst sich ab und zeigt keine Fluoreszenz mehr. Mit Hilfe eines HRM-geeigneten Gerätes, das in sehr genauen und feinen Schritten die Temperatur anheben kann (Schritte von 0,01 °C sind möglich) und auch eine gute optische Einheit besitzt, die selbst kleine Fluoreszenzveränderungen detektieren kann, können so einzelne Mutationen erkannt werden (REED et al., 2007; DRUML & CICHNA-MARKL, 2014). Dies ermöglicht sogar die Messung eines einzelnen Basenaustausches (single nucleotide polymorphism, SNP) (VENABLES et al., 2014). Es gelten jedoch besondere Bedingungen, die für eine erfolgreiche HRM erfüllt werden müssen. Der wichtigste Faktor ist die Länge des Amplikons. Dieses sollte nicht länger als 300 Basenpaare sein, da sonst auch mit der HRM-Methode kleine Unterschiede wie einzelne Punktmutationen nicht mehr erfasst werden können. Des Weiteren sollte die verwendete DNS eine gute Qualität und Reinheit aufweisen und in vergleichbaren Mengen verwendet werden.

Die HRM unterscheidet sich von der klassischen Schmelzanalyse nicht nur durch die verbesserte Hardware und andere Farbstoffe, sondern auch durch eine andere Datenverarbeitung durch die Software. Diese führt mit den Fluoreszenz-Rohdaten zunächst eine „Normalisierung“ durch. Dies bedeutet, dass kleine Ungleichheiten ausgeglichen werden, indem alle untersuchten Proben bei festgelegten Temperatur-Werten auf den Fluoreszenz-Wert 100 bzw. 0 geeicht werden. Dies erlaubt einen Vergleich der unterschiedlichen Schmelzkurven unter gleichen Bedingungen. Eine weitere Vergleichsmöglichkeit bietet der „Difference Plot“. Hier wird von den normalisierten Schmelzkurven eine Probe durch den Nutzer als Referenz ausgewählt und die Fluoreszenzwerte werden von den übrigen Kurven abgezogen. Hierdurch wird die Referenzkurve zur Nulllinie und der Unterschied der übrigen Kurven zu der Referenzkurve deutlicher dargestellt (REED et al., 2007; DRUML & CICHNA-MARKL, 2014).

Die Ausprägung der Schmelzkurvenverschiebungen einer HRM richtet sich danach, welche Basen bei der zu untersuchenden Veränderung ausgetauscht wurden. Dies ist gut für die kleinstmögliche Mutationsart, der Punktmutation oder auch SNP (single nucleotide polymorphism) beschrieben. Diese SNPs können in insgesamt vier Klassen unterteilt werden. Die Übersicht in Tabelle 4 zeigt, dass sich diese Klassen einerseits nach der Häufigkeit des

Auftretens im humanen Genom richten, andererseits aber auch einen Aufschluss über die zu erwartende Schmelzkurvenverschiebung geben. Diese ist bei Klasse 1 am höchsten und wird mit Ansteigen der Klasse geringer. Hierin liegt die entscheidende Bedeutung der SNP-Klassen für die HRM-Analyse. So sind die Schmelzkurven einer DNS mit einem SNP der Klasse 1 deutlich von denen der nicht mutierten Probe abzugrenzen, wohingegen SNPs der Klasse 4 besonders schwer zu differenzieren sind (LIEW et al., 2004; KRENKOVA et al., 2009).

Tabelle 4: Übersicht für die unterschiedlichen SNP-Klassen und die damit verbundenen Eigenschaften. Quelle: (LIEW et al., 2004)

SNP Klasse	Basenaustausch	Häufigkeit im Menschlichen Genom	Schmelzkurvenverschiebung
1	C/T + G/A	0,662	>0,5 °C
2	C/A + G/T	0,176	0,2-0,5 °C
3	C/G	0,088	
4	A/T	0,074	< 0,2 °C

III MATERIAL UND METHODEN

1 Anzucht und Konservierung der *Salmonella*-Isolate

Alle verwendeten Stämme wurden mit Hilfe des Cryobank® Systems (Mast Diagnostika, Reinfeld, Deutschland) nach Herstellerangaben bei -70 °C konserviert. Teilweise lagen die verwendeten Stämme bereits bei Beginn der Arbeit kryokonserviert vor. Jene Stämme wurden, da sie teilweise bereits seit einigen Jahren eingefroren waren, auf ihre Lebensfähigkeit hin überprüft. Dies geschah, indem jeweils eine Perle des Cryobank® Systems auf ein Trypton-Soya Agar mit Schafsblut (TSASB)-Nährmedium (Oxoid, Wesel, Deutschland) gegeben und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet wurde. Hier konnte bei allen Proben ein gutes Wachstum festgestellt werden. Die Stämme waren folglich durch den teils mehrere Jahre andauernden Gefrierprozess nicht in ihrer Lebensfähigkeit beeinträchtigt worden.

Die jüngeren Stämme lagen zu Beginn der Arbeit lediglich auf Amies-Tupfern vor. Diese wurden auf Rambach-Nährmedien aufgebracht und mit einer Öse ausgestrichen. Hierauf erfolgte ebenfalls eine aerobe Bebrütung von 24 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde ausreichend Material von allen angezüchteten Salmonellen-Isolaten mit einem steril verpackten Tupfer (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) aufgenommen und in das Kryomedium suspendiert. Dieses wurde letztlich mit einer Einmalpipette abgesaugt und die zurückbleibende Probe für spätere Verwendungen bei -70 °C eingefroren.

Es wurden insgesamt 310 Proben gesammelt und konserviert. Die 310 Proben enthielten jedoch identische Stämme (gleiche Serovare aus den gleichen Betrieben). Diese wurden für die weiteren Versuche nicht verwendet, wodurch letztlich 31 Serovare mit insgesamt 214 einzigartigen Stämmen übrig bleiben.

Alle vorhandenen Daten zu den Isolaten wie Isolierungsjahr, Isolierungsort, Tierart und Serovar wurden erfasst. Anschließend wurden Isolate abhängig vom Untersuchungsziel ausgewählt.

2 Verwendete Proben

2.1 SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011

Für die Untersuchung mittels SYBR-Green Multiplex PCR war die Prüfung aller in Tabelle 5 genannten 210 Isolate möglich, da die Untersuchung im Einfach-Ansatz erfolgen konnte.

Tabelle 5: Überblick über die für die Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendeten Proben. Die Proben wurden in unterschiedlichen Betrieben isoliert und stammen von den genannten Tierarten. Die Kategorie „Sonstige“ setzt sich bei *Salmonella* Typhimurium aus zwei Impfstämmen (IS), einem Stamm aus der Probe eines Igels, einem Stamm aus der Probe eines Hundes sowie einem DSMZ-Stamm zusammen. Bei *Salmonella* Enteritidis besteht sie aus zwei Impfstämmen. Für *Salmonella* Glostrup wurde ein Stamm aus einer Lebensmittelprobe verwendet. Außerdem findet sich bei *Salmonella* Schwarzengrund das Isolat aus der Probe eines Reptils.

Serovar	Anzahl	Mensch	Huhn	Schwein	Rind	Pferd	Sonst. Geflügel	Schaf	Sonst.
<i>S. Typhimurium</i>	67		21	21	11	2	7		5
<i>S. Enteritidis</i>	35		32	1					2
<i>S. Infantis</i>	13	10	3						
<i>S. Bredeney</i>	11	2	9						
<i>S. Derby</i>	8	7	1						
<i>S. Kentucky</i>	6	6							
<i>S. Hadar</i>	5	2	3						
<i>S. Mbandaka</i>	5	3	2						
<i>S. Agona</i>	4	4							
<i>S. Blockley</i>	4		4						
<i>S. Dublin</i>	5				5				
<i>S. Isangi</i>	4	1	3						
<i>S. Kottbus</i>	4	3	1						
<i>S. Ohio</i>	4	2		1	1				
<i>S. Virchow</i>	4	4							
<i>S. Livingstone</i>	3		1	1	1				
<i>S. Montevideo</i>	3	1	2						
<i>S. Rissen</i>	3	1		2					
<i>S. Schwarzengrund</i>	3	2							1
<i>S. Senftenberg</i>	3	1	1		1				
<i>S. Subspezies IIIb</i>	3	2						1	
<i>S. Tennessee</i>	3	2		1					
<i>S. Give</i>	2	1			1				
<i>S. Abony</i>	1							1	
<i>S. Anatum</i>	1		1						
<i>S. Choleraesuis</i>	1			1					
<i>S. Glostrup</i>	1								1
<i>S. Goldcoast</i>	1	1							
<i>S. Indiana</i>	1		1						
<i>S. Lexington</i>	1		1						
<i>S. Schleissheim</i>	1				1				
Summe	210	55	86	28	21	2	7	2	9

Tabelle 6 zeigt zusätzlich die Verteilung der Proben auf die jeweiligen Isolationsjahre.

Tabelle 6: Übersicht über das Isolationsjahr der Proben, die für die SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendet wurden.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Ges.
Probenzahl	4	22	2	10	40	2	6	61	63	210

2.2 HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

Aufgrund des deutlich höheren Arbeitsaufwandes bei der HRM-Analyse wurde die Gruppe der 210 Stämme (31 Serovare), welche im SYBR-Green Assay nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendet wurden, auf 100 Isolate (21 Serovare) eingeeengt.

Die HRM-Analyse muss zur Sicherstellung eines eindeutigen Ergebnisses im Dreifachansatz durchgeführt werden. Der hieraus resultierende Kosten- und Zeitaufwand wäre bei Prüfung aller verfügbaren Isolate zu umfangreich ausgefallen. Folglich musste eine Selektion vorgenommen werden. Die hieraus resultierende Auswahl enthielt sowohl tierseuchenrechtlich relevante Stämme, wie die nach der Geflügel-Salmonellen-Verordnung mitteilungspflichtigen Isolate *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Infantis und *Salmonella* Hadar, als auch Serovare mit einem hohen Anteil an veterinärmedizinischen Proben. Stark vertretene Serovare, wie beispielsweise *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis, wurden auf eine repräsentative Auswahl beschränkt. Im Falle weniger zahlreich vorhandener Serovare wurden, um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis für das jeweilige Serovar zu erhalten, die veterinärmedizinischen Isolate weiterhin mit Stämmen aus der Humanmedizin oder dem Lebensmittelbereich ergänzt. Dadurch wurden die Proben auf 100 Stämme (21 Serovare) reduziert (Tabelle 7). Einen Aufschluss darüber, wie viele Proben in welchen Jahren isoliert wurden, gibt zusätzlich Tabelle 8.

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht aller für die HRM nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten *Salmonella*-Serovare und ihrer Herkunft. Die Kategorie „Sonstige“ setzt sich bei *Salmonella* Typhimurium aus zwei Impfstämmen (IS), einem Stamm aus der Probe eines Hundes sowie einem DSMZ-Stamm zusammen. Bei *Salmonella* Enteritidis besteht sie wiederum aus zwei Impfstämmen. Auch das Isolat einer Lebensmittelprobe des Serovars *Salmonella* Glostrup wurde hier verwendet. Außerdem findet sich bei *Salmonella* Schwarzengrund und *Salmonella* Rissen je eine Probe eines Reptils. Die Auswahl der *Salmonella* Typhimurium Stämme enthielt fünf Stämme der Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) und drei Stämme der Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2).

Serovar	Anzahl	Mensch	Geflügel	Schwein	Rind	Pferd	Schaf	Sonstige
S. Typhimurium	20		6	5	4	1		4
S. Enteritidis	16		13	1				2
S. Bredeney	10	1	9					
S. Dublin	6				5		1	
S. Hadar	5	2	3					
S. Infantis	5	2	3					
S. Blockley	4		4					
S. Isangi	4	1	3					
S. Rissen	4	1		2				1
S. Derby	3	2			1			
S. Livingstone	3		1	1	1			
S. Montevideo	3	1	2					
S. Ohio	3	1		1	1			
S. Senftenberg	3	1	1		1			
S. Give	2	1			1			
S. Lexington	2		2					
S. Schwarzengrund	2	1						1
S. Virchow	2	2						
S. Anatum	1		1					
S. Choleraesuis	1			1				
S. Glostrup	1							1
Summe	100	16	48	11	14	1	1	6

Tabelle 8: Übersicht über das Isolationsjahr der Proben, die für die HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

	2004	2005	2007	2008	2010	2011	2012	Ges.
Probenzahl	2	12	6	24	6	16	34	100

Außerdem zeigt Tabelle 9, in wie weit sich die getroffene Serovar-Auswahl mit der Auswahl in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 gleicht bzw. unterscheidet. Zusammengefasst sind dies elf übereinstimmende Serovare und 19 Serovare, die nur in einem der beiden Versuche verwendet wurden.

Tabelle 9: Kurzer Überblick über die im eigenen Versuch verwendeten Serovare und die im Aufbau nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 geprüften Serovare. Die elf Serovare, die in beiden Versuchen Verwendung fanden, sind grau hinterlegt.

Eigene Serovare	Serovare (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011)
S. Anatum	
	S. Abony
S. Blockley	
	S. Agona
S. Bredeney	
	S. Chester
S. Choleraesuis	
S. Derby	S. Derby
S. Dublin	S. Dublin
S. Enteritidis	S. Enteritidis
S. Give	
S. Glostrup	S. Glostrup
	S. Goldcoast
S. Hadar	S. Hadar
S. Infantis	S. Infantis
S. Isangi	S. Isangi
	S. Kottbus
S. Lexington	
S. Livingstone	S. Livingstone
	S. London
	S. Manhattan
	S. Mbandaka
S. Montevideo	S. Montevideo
	S. Newport
S. Ohio	
S. Rissen	
S. Schwarzengrund	
S. Senftenberg	
S. Typhimurium	S. Typhimurium
S. Virchow	S. Virchow

2.3 Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung

Neben den in Deutschland zugelassenen vier Lebendimpfstämmen, bestehend aus je einem *Salmonella*-Typhimurium- und *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm der Firmen IDT Diagnostika (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) bzw. Lohmann Animal Health (Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG, Cuxhaven), wurden insgesamt 53 Feldstämme verwendet. Deren Auswahl setzte sich aus 28 *Salmonella*-Enteritidis- und 25 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämmen zusammen. Die Proben stammten hauptsächlich von Hühnern, lediglich vier der *Salmonella*-Typhimurium-Stämme mussten von anderen Tierarten (Tauben, Rind, Schwein) herangezogen werden. Dies diente zur Ergänzung der Probenreihe, um die *Salmonella*-Typhimurium-Varianten O5-negativ (1,4,12:i:1,2) sowie monophasisch (1,4,[5],12:i:-). Tabelle 10 zeigt von welcher Tierart, Tabelle 11 in welchem Jahr die jeweiligen Serovare isoliert wurden. Zusätzlich werden in Tabelle 12 die Proben, welche in den Gerätevergleichsläufen verwendet wurden, gezeigt.

Tabelle 10: Übersicht über die Herkunft der verwendeten Proben.

Serovar	Impfstoff	Huhn	Rind	Schwein	Taube	Gesamt
S.-Enteritidis-Impfstämme	2					2
S.-Typhimurium-Impfstämme	2					2
S.-Enteritidis-Feldstämme		28				28
S.-Typhimurium-Feldstämme		21				21
S. Typhimurium (1,4,5,12:i:-)			1	1		2
S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)					1	1
S. Typhimurium (1,4,12:i:-)			1			1
Gesamt	4	49	2	1	1	57

Tabelle 11: Übersicht über das jeweilige Isolationsjahr der verwendeten Proben. Für das Jahr 2006 war kein Isolat vom Huhn vorhanden.

Serovar	2004	2005	2007	2008	2009	2010	2011	2012	Ges.
S.-Enteritidis-Impfstämme								2	2
S.-Typhimurium-Impfstämme								2	2
S.-Enteritidis-Feldstämme	4	14	4		1		3	2	28
S.-Typhimurium-Feldstämme		1		17	1	1		1	21
S. Typhimurium (1,4,5,12:i:-)						1		1	2
S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)								1	1
S. Typhimurium (1,4,12:i:-)								1	1
Gesamt	4	15	4	17	2	2	3	10	57

Tabelle 12: Überblick über die für die Vergleichsläufe auf dem LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und dem Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendeten Proben. Für den Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) musste auf Grund der verringerten Probenkapazität eine Reduktion der Probenanzahl erfolgen.

Serovar	2004	2005	2007	2008	2010	2011	2012	Herkunft	LC 480	Rotor Gene
S.-Enteritidis-Impfstamm (IDT)							x	Impfstoff	x	x
S.-Enteritidis-Impfstamm (LAH)							x	Impfstoff	x	x
S.-Typhimurium-Impfstamm (IDT)							x	Impfstoff	x	x
S.-Typhimurium-Impfstamm (LAH)							x	Impfstoff	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 1	x							Huhn	x	
S. Enteritidis Feldstamm 2	x							Huhn	x	
S. Enteritidis Feldstamm 3		x						Huhn	x	
S. Enteritidis Feldstamm 4		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 5		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 6		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 7		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 8		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 9		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 10		x						Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 11			x					Huhn	x	x
S. Enteritidis Feldstamm 12						x		Huhn	x	
S. Enteritidis Feldstamm 13							x	Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 1		x						Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 2				x				Huhn	x	
S. Typhimurium Feldstamm 3				x				Huhn	x	
S. Typhimurium Feldstamm 4				x				Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 5				x				Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 6				x				Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 7				x				Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 8				x				Huhn	x	x
S. Typhimurium Feldstamm 9					x			Huhn	x	x
S. Typhimurium (1,4,5,12:i:-)					x			Rind	x	x
S. Typhimurium (1,4,5,12:i:-)						x		Schwein	x	
S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)							x	Taube	x	x
S. Typhimurium (1,4,12:i:-)							x	Rind	x	
Gesamt	2	9	1	7	2	2	7	30	30	22

3 DNS-Extraktion

Wie bereits in Kapitel III.1 beschrieben, wurden alle Proben bei -70 °C mit Hilfe des Cryobank Systems (Mast Diagnostika, Reinfeld, Deutschland) gelagert. Anschließend wurde Material auf ein Trypton-Soya Agar mit Schafsblut (TSASB)-Nährmedium (Oxoid, Wesel, Deutschland) aufgetragen und über Nacht für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Hierauf wurde, wie in den folgenden Punkten beschrieben, unterschiedlich verfahren.

3.1 Hitzeextraktion für die Multiplex-PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011

Für die bei der Multiplex-PCR durchgeführte Hitzeextraktion wurde ein Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml steriler 0,9 % Kochsalzlösung befüllt. Anschließend wurde eine Kolonie des gewünschten Stammes mit Hilfe eines steril verpackten Tupfers aufgenommen und in der Flüssigkeit suspendiert. Hierauf wurde die Probe für eine Dauer von zehn Minuten bei 99 °C in einem Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) hitzelysiert.

3.2 Extraktion für die Sequenzierungs-PCRs und die HRM-Reaktionen

Die DNS-Extraktion erfolgte unter Verwendung des DNeasy® Blood & Tissue Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierbei wurden 1-3 Kolonien (variierend je nach der jeweiligen Größe) in 2 ml sterilem Wasser aufgelöst. Um eine vergleichbare Dichte zu gewährleisten, wurden alle Proben auf 0,5 McFarland eingestellt. Dies entsprach $9,9 \times 10^5$ KBE/ml. Im Anschluss wurde 1 ml der Suspension entnommen und gemäß den Herstellerangaben des DNeasy® Blood & Tissue Kits aufbereitet.

4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden durch TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Für die Synthese wurde zum einen die Reinigung durch Gelfiltration (GSF) für die Sequenzierungsprimer und zum anderen die Reinigung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) für die HRM-Primer gewählt. Der Unterschied der beiden Reinigungsmethoden liegt darin, dass bei der GSF Reinigung Nebenprodukte entstehen, welche jedoch im Allgemeinen keinen Einfluss auf die Spezifität der Produkte haben. Bei der HPLC Reinigung werden diese Nebenprodukte zusätzlich entfernt.

Selbst entwickelte Primer wurden anhand der Genomsequenz von *Salmonella*-Typhimurium-14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1) und *Salmonella*-Enteritidis-str.EC20111175 (Gendatenbank-Sequenznummer CP007252.1) mit Hilfe des Programmes Primer 3 (KORESSAAR & REMM, 2007; UNTERGASSER et al., 2012) erstellt.

Alle selbst designten Primer wurden mit Hilfe von NCBI-BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) auf ihre Spezifität hin geprüft.

5 SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011

5.1 Prinzipieller Aufbau

Die Autoren der Publikation wählten zunächst fünf Primerpaare, anhand derer die Serovare in fünf Gruppen unterteilt werden sollten. Diese Multiplex PCR (PCR I) wurde zunächst mit neun verschiedenen Serovaren ausgeprüft. Bei diesem Test fanden sich letztlich in zwei der fünf Gruppen mehr als ein Serovar wieder. Hierauf wurden zwei weitere Multiplex PCRs (PCR II-G1 und PCR II-G3) entwickelt und hinzugefügt, um diese Gruppen ebenfalls differenzieren zu können (siehe Abbildung 2).

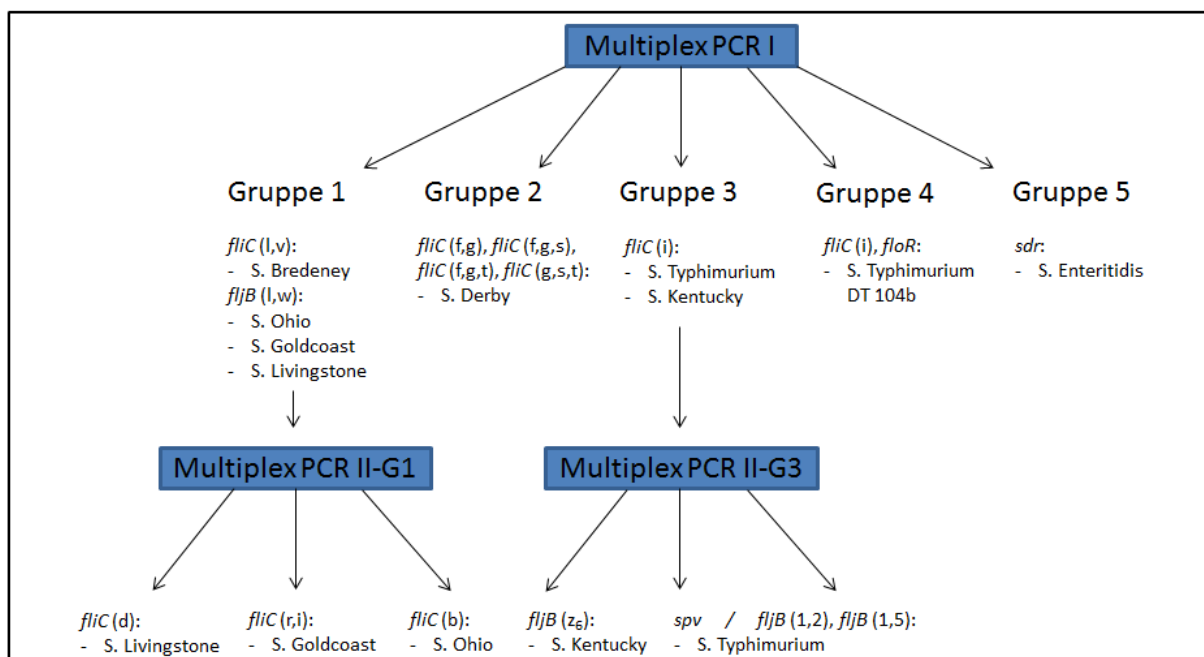


Abbildung 2: Nach Rajtak et al. (RAJTAK et al., 2011).

Überblick über das ursprüngliche Schema aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011. Gezeigt werden die anfänglich verwendeten neun Teststämme, die anhand der PCR I in fünf Gruppen unterteilt werden. Da sich in den Gruppen 1 und 3 mehr als ein Stamm wiederfand, wurden diese noch mit Hilfe der PCR II-G1 bzw. II-G3 ausdifferenziert.

Im Anschluss wurden weitere Stämme anhand dieses prinzipiellen Aufbaus überprüft. Zu beachten ist hier, dass sich eng an das vorgegebene Schema gehalten wurde und bei Stämmen, die in der PCR I kein Produkt lieferten, keine weiteren Reaktionen durchgeführt wurden. Dieser Umstand sowie die übrigen Ergebnisse der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 finden sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Überblick der gesamten Ergebnisse aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011. Zu sehen sind die verwendeten Serovare in Verbindung mit den jeweiligen Zielgenen und den Schmelzpunkten der resultierenden Produkte. Die jeweiligen Abweichungen der Proben eines Serovars werden in Klammern hinter dem jeweiligen Wert genannt. Sofern die PCR I kein Produkt hervorbrachte wurden die anderen Reaktionen nicht mehr durchgeführt. Quelle: (RAJTAK et al., 2011).

Serovare (Anzahl)	Multiplex PCR I (Tm)				Gruppe	C _T	Multiplex PCR II-G1 (Tm)			C _T	Multiplex PCR II-G3 (Tm)			
	<i>fljC</i> (i,v), <i>fljB</i> (i,w)	<i>fljC</i> (f,g), <i>fljC</i> (f,g,s), <i>fljC</i> (f,g,t), <i>fljC</i> (g,s,t)	<i>fljC</i> (i)	<i>floR</i>			<i>fljC</i> (d)	<i>fljC</i> (r,i)	<i>fljC</i> (b)		<i>spv</i>	<i>fljB</i> (1,2), <i>fljB</i> (1,5)	<i>fljB</i> (z ₆)	C _T
S. Bredeney (2)	77.4 (0.3)	-	-	-	1	17.2 (0.1)	-	-	-	30.0 (0.8)	-	-	-	-
S. Give (2)	77.8 (0.2)	-	-	-	1	16.5 (0.1)	-	-	-	30.1 (0.7)	-	-	-	-
S. Goldcoast (1)	77.9 (0.1)	-	-	-	1	16.7 (0.2)	-	79.1 (0.1)	-	15.9 (0.1)	-	-	-	-
S. Livingstone (3)	78.9 (0.3)	-	-	-	1	16.3 (1.3)	77.0 (0.2)	-	-	16.1 (0.3)	-	-	-	-
S. London (2)	77.8 (0.2)	-	-	-	1	16.4 (0.1)	-	-	-	30.4 (0.6)	-	-	-	-
S. Ohio (1)	78.0 (0.2)	-	-	-	1	16.2 (0.5)	-	-	81.7 (0.1)	16.0 (0.0)	-	-	-	-
S. Panama (2)	77.8 (0.1)	-	-	-	1	15.4 (0.5)	-	-	-	30.3 (0.8)	-	-	-	-
S. Worthington (1)	78.4 (0.2)	-	-	-	1	16.1 (0.0)	-	-	-	30.3 (0.2)	-	-	-	-
S. Agona (5)	-	79.3 (0.2)	-	-	2	16.3 (0.3)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Berta (1)	-	79.2 (0.1)	-	-	2	19.1 (0.1)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Derby (3)	-	78.9 (0.2)	-	-	2	16.2 (0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Havana (1)	-	79.2 (0.1)	-	-	2	17.5 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Rissen (2)	-	79.1 (0.3)	-	-	2	16.1 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Senftenberg (2)	-	79.3 (0.3)	-	-	2	15.2 (0.0)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. 4,[5],12:- (1)	-	-	81.8 (0.2)	-	3	17.0 (1.0)	-	-	-	-	-	-	-	29.6 (4.6)
S. Kentucky (4)	-	-	81.6 (0.3)	-	3	15.1 (0.7)	-	-	-	-	-	-	78.4 (0.4)	16.2 (0.8)
S. Typhimurium (5)	-	-	81.6 (0.3)	-	3	15.9 (1.3)	-	-	-	-	76.6 (0.2)	80.6 (0.2)	-	16.7 (1.4)
S. Typhimurium (7)	-	-	81.2 (0.3)	85.1 (0.3)	4	15.0 (0.8)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Enteritidis (2)	-	-	-	-	5	15.6 (0.0)	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Kedougou (2)	77.9 (0.3)	-	81.6 (0.2)	-	1.3	15.9 (0.2)	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle 13. Alle hier gezeigten Proben lieferten kein Produkt in der PCR I und wurden daher in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 nicht weiter geprüft.

Serovare (Anzahl)	Multiplex PCR I (Tm)					Multiplex PCR II-G1 (Tm)			C _T	Multiplex PCR II-G3 (Tm)				
	<i>fliC</i> (l,v), <i>fliJ</i> (l,w)	<i>fliC</i> (f,g), <i>fliC</i> (f,g,s), <i>fliC</i> (f,g,t), <i>fliC</i> (g,s,t)	<i>fliC</i> (i)	<i>floR</i>	<i>sdr</i>	Gruppe	<i>fliC</i> (d)	<i>fliC</i> (r,i)		<i>fliC</i> (b)	C _T	<i>spv</i>	<i>fliJ</i> (1,2), <i>fliJ</i> (1,5)	<i>fliJ</i> (z ₆)
S. Anatum (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.1 (1.7)					
S. Dublin (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.9 (2.0)					
S. Hadar (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.0 (2.2)					
S. Heidelberg (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.9 (0.9)					
S. Indiana (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.3 (1.1)					
S. Infantis (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.9 (0.7)					
S. Java (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.7 (0.9)					
S. Kottbus (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.2 (1.9)					
S. Manhattan (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	26.9 (0.4)					
S. Mbandaka (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.6 (1.1)					
S. Minnesota (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.8 (1.5)					
S. Newport (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.4 (0.4)					
S. Nottingham (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.3 (0.6)					
S. Reading (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	29.9 (1.3)					
S. Saintpaul (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.5 (1.0)					
S. Stanley (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.5 (1.5)					
S. Tennessee (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.8 (1.4)					
S. Virchow (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.8 (1.0)					
C. freundii (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.5 (0.9)					
E. coli (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	31.3 (0.0)					
E. tarda (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	31.3 (0.1)					
E. aerogenes (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.9 (0.2)					
E. cloacae (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.2 (0.0)					
E. faecalis (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	33.0 (1.1)					
E. faecium (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	31.2 (2.7)					
K. pneumonia (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	28.9 (0.2)					
P. mirabilis (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	33.0 (1.0)					
P. vulgaris (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	33.5 (1.3)					
P. aeruginosa (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.4 (0.9)					
Y. enterocolitica (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	31.5 (0.0)					
NTC									30.9 (1.1)					

5.2 Eigene Durchführung der PCR

Für die eigene Durchführung der Methode wurden die in Kapitel III.2.1 genannten Salmonellen-Serovare verwendet, welche mit der in Kapitel III.3.1 beschriebenen Methode extrahiert wurden. Der Aufbau besteht aus insgesamt drei Multiplex-PCRs (PCR I, II-G1 und II-G3).

Die Autoren der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 wählten für die PCRs eine Auswahl verschiedener Primer und Zielgene mit unterschiedlichen Eigenschaften. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Übersicht über die in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendeten Primer und Zielgene.

Primer	Produktgröße	Primersequenz (5'-3')	PCR	Zielgen	Gen-Charakter
FliC/ FljB-1	92 bp	GGCGACGCTACTAAAAATGG ATGCCTCCTGTCACTTTCGT	PCR I	<i>fliC</i> (l,v), <i>fljB</i> (l,w)	Flagellar-Gene
FliC-g	130 bp	ACAAAACAGCTTCTGGCGTT CCCAGAGAAGAACGAAGTGC	PCR I	<i>fliC</i> (f,g), <i>fliC</i> (f,g,s), <i>fliC</i> ((f,g,t), <i>fliC</i> ((g,s,t)	
FliC-i	143 bp	ACGGTGAGGTGACTCTTGCT AACACCTGCTGCTGTCAATG	PCR I	<i>fliC</i> (i)	
FliC-d	136 bp	TGTTAAAGGTGGTGCTGCTG TATGGCAGTTGTTGCCTGAA	PCR II-G1	<i>fliC</i> (d)	
FliC-r,i	111 bp	GCAGATGACGGTACATCCAA ACCTTCGGCTTTACTTGACAG	PCR II-G1	<i>fliC</i> (r,i)	
FliC-b	148 bp	ACCATGACCGCAAATAAAGC TATTACCTGTGCGCCCTGTC	PCR II-G1	<i>fliC</i> (b)	
FljB-z6	149 bp	GGCTATGGAGGCGGGTAAACA TGACAACCTGGGCAGCAGCA	PCR II-G3	<i>fljB</i> (z6)	
FljB-1,2/1,5	112 bp	ACTGGTGCTGATGCCGCCAAAA TTGTCGCACCAGCAGGCATTG	PCR II-G3	<i>fljB</i> (1,2), <i>fljB</i> (1,5)	
FloR	142 bp	GGAGCAGCTTGCTCTTCAAC CGTAGATGACGACACCCTCA	PCR I	<i>floR</i>	Multiresistenz-Gen
Sdr	144 bp	CAACACGCGCTGGGGGAAC GCTACTGACGCCACGACGA	PCR I	sdr	"short-chain dehydrogenase/reductase"
Spv	80 bp	CGTCACCCTAGGCCCGCAAA TCGGTCCGTTCCGAGCAGAAA	PCR II-G3	spv	Virulenz-Gen

Die PCRs wurden exakt nach den Angaben aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 auf dem real-time PCR-Gerät Mx3000p® (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels MxPro v. 4.10 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Alle 210 Isolate wurden, abweichend von den Angaben in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011, in allen drei PCRs (I, II-G1 und II-G3) untersucht.

Nachfolgend, in den Tabellen 15-17, sind die Zusammensetzungen der jeweiligen Reaktionsgemische abgebildet. In allen drei Gemischen wurde der Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die PCR wurde mit einem zweistufigen Thermoprofil durchgeführt (Tabelle 18).

Tabelle 15: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR I.

Reagenzien	Konzentration/Volumen
FliC/FliB-1 Forward-Primer	3,0 µM
FliC/FliB-1 Reverse-Primer	3,0 µM
FliC-g Forward-Primer	3,0 µM
FliC-g Reverse-Primer	3,0 µM
FliC-i Forward-Primer	1,5 µM
FliC-i Reverse-Primer	3,0 µM
FloR Forward-Primer	0,5 µM
FloR Reverse-Primer	3,0 µM
Sdr Forward-Primer	3,0 µM
Sdr Reverse-Primer	3,0 µM
Power Sybr Green Master Mix	1,0X
Wasser	2,8 µl
Probe	2,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR II-G1.

Reagenzien	Konzentration/Volumen
FliC-d Forward-Primer	3,0 µM
FliC-d Reverse-Primer	3,0 µM
FliC-r,i Forward-Primer	3,0 µM
FliC-r,i Reverse-Primer	3,0 µM
FliC-b Forward-Primer	3,0 µM
FliC-b Reverse-Primer	3,0 µM
Power Sybr Green Master Mix	1,0X
Wasser	4,4 µl
Probe	2,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die Multiplex-PCR II-G3.

Reagenzien	Konzentration/Volumen
Spv Forward-Primer	3,0 µM
Spv Reverse-Primer	3,0 µM
FljB-z6 Forward-Primer	3,0 µM
FljB-z6 Reverse-Primer	3,0 µM
FljB-1,2/1,5 Forward-Primer	3,0 µM
FljB-1,2/1,5 Reverse-Primer	3,0 µM
Power Sybr Green Master Mix	1,0X
Wasser	4,4 µl
Probe	2,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 18: Thermoprofil für die drei Multiplex PCRs.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	95	10:00
Denaturierung	40	95	00:15
Amplifikation		60	01:00

Die Auswertung der PCR erfolgte anhand der Ct-Werte (threshold cycle: die zu messende Amplifikationsreaktion überschreitet einen bestimmten Basiswert) und der Schmelzpunkte. Hierbei wurden lediglich Ct-Werte von 15-30 (PCR I und PCR II-G1) und 15-25 (PCR II-G3) als spezifische Amplifikation betrachtet. Alle Ergebnisse wurden in die Tabellen in Anhang 1-3 eingetragen. Die korrekte Größe der Produkte wurde stichprobenartig mit mindestens einem Stellvertreter jedes Serovars in der Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurde ein 4 %iges Agarose-Gel hergestellt, eine Spannung von 100 Volt angelegt und die Produkte über eine Zeitspanne von 75 Minuten nach ihrer jeweiligen Größe aufgetrennt. Dies erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer vom Typ Whatman Horizon 11.14 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Als DNS-Marker wurde eine 20 bp Leiter (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Bei Produkten, die abweichende Ergebnisse im Vergleich zu Proben des gleichen Serovars lieferten, wurde die jeweilige PCR als Singleplex-PCR mit dem jeweiligen Primerpaar wiederholt und sowohl der Schmelzpunkt als auch das Produkt nochmals überprüft.

6 HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

Der Aufbau der HRM besteht aus acht Primerpaaren. Diese acht Paare zielen auf drei unterschiedliche Gruppen von Produkten.

Die erste Gruppe (mit den Paaren „A“, „I“ und „K“) besteht aus kurzen Produkten (127 bp, 148 bp und 105 bp), welche aus verschiedenen variablen Teilen des Genoms synthetisiert werden. So bezieht sich A auf einen Genort, welcher ein Typ-II-Sekretion Adenosin-5'-Triphosphat bindendes Protein kodiert, I auf den Ort eines hypothetischen Proteins und K auf die *fimA* Genregion. Diese Gruppe wird in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 als „short targets“ zusammengefasst.

Die zweite Gruppe mit den Vertretern „CR1“, „CR2“ und „CR_F“ liefert variable Produktgrößen. Dies liegt darin begründet, dass es sich bei den Zielgenregionen um CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Regionen handelt. Diese sind von wiederkehrenden Gensequenzen (Repeats) geprägt, welche wiederum durch nicht wiederkehrende Einschübe (Spacers) unterbrochen werden. Da diese beiden Elemente sehr variabel in ihrer Größe ausfallen können, gilt selbiges auch für die resultierenden Produkte. In jedem Fall liefern die CRISPR-Zielgene die größten Produkte. Ein stichprobenartiger Vergleich der Primersequenzen mit vorliegenden Gesamt-Genom Sequenzen in der NCBI-BLAST Datenbank (ALTSCHUL et al., 1990) zeigte eine starke Schwankung der Produktgrößen. Diese reichte von 501 bp bis zu 1828 bp.

Bei der dritten Gruppe handelt es sich letztlich um die Primerpaare für die Zielgene „*yohM*“ und „*shdA*“. Diese sind VNTR (Variable Number Tandem Repeats) genannte, ebenfalls durch Repeats gekennzeichnete Regionen. Da auch hier, aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an möglichen Repeats, die Produktgröße variabel ausfallen kann, wurden ebenfalls mit Hilfe der NCBI-BLAST Datenbank (ALTSCHUL et al., 1990) mögliche Produktgrößen bestimmt. Die Schwankung fällt hier jedoch bedeutend milder aus, so dass die Produktgrößen in einem Bereich von 176 bp bis 269 bp vorgefunden werden konnten.

Für die Primerpaare (A, I, K) wird das gleiche Thermoprofil verwendet, alle weiteren verwenden unterschiedliche Thermoprofile.

Eine Übersicht über alle in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten Primer und deren Thermoprofil findet sich in Tabelle 19.

6.1 Konzipierung, Aufbau und Durchführung der HRM-Analyse

Die im folgenden Kapitel (III.6.1.1) beschriebenen Überprüfungen wurden lediglich mit dem LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die später in Kapitel III.6.1.2 dargestellte Etablierung der HRM-Analyse hingegen lief vergleichend sowohl auf dem LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), als auch auf dem LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), der zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls zur Verfügung stand.

6.1.1 Tests und Anpassungen im Vorfeld

6.1.1.1 Anpassung des Protokolls

Um eine noch höhere Spezifität zu erzielen, wurden die ursprünglichen Protokolle (siehe Tabelle 19) zu einer Touchdown-PCR modifiziert. Der Vorteil hierbei ist eine Minderung unspezifischer Bindung von Primern an die DNS und damit eine Minimierung der unspezifischen Produktbildung. Die Temperatur lag im ersten Zyklus folglich jeweils 10 °C über der in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 angegeben Temperatur und sank dann in den ersten zehn Zyklen um je 1 °C auf die publizierte Temperatur herab. Außerdem wurde die Dauer der initialen Denaturierung auf zehn Minuten erhöht, da dies für zwei der geprüften Farbstoffe notwendig war. Da die Publikation keine genauen Angaben über das Thermoprofil des Melting-Schrittes gibt, wurde dieses, wie in Tabelle 20 aufgezeigt, gewählt.

Tabelle 20: Die gewählten Werte für den Melting-Schritt. Die ersten beiden Abschnitte dienen als Übergang zwischen PCR und HRM. Abschnitt 3 und 4 stellen die schrittweise Anhebung der Temperatur von 65 °C auf 95 °C dar. Während diesem Zeitraum erfolgte eine durchgehende Erfassung der Fluoreszenz (25 Messwerte pro °C). * Die Ramp Rate des letzten Schritts wurde automatisch durch die Cycler festgelegt.

Temp. (°C)	Zeit (mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	01:00	4.4
40	01:00	2.2
65	00:05	4.4
95	-	*

Die beschriebenen Thermoprofile wurden auf beiden Thermocycler-Systemen (LightCycler® 480 und LightCycler® 96) identisch verwendet.

6.1.1.2 Auswahl des Farbstoffes

Zunächst sollte der für die plattenbasierten LightCycler®-Systeme bestgeeignetste Farbstoff ausgewählt werden. Hierfür wurden drei Farbstoff- bzw. Mastermix-Kombinationen ausgewählt. Dies waren die Folgenden:

- SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Bestellnummer: S-34854, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit dem Farbstoff SYTO® 9
- LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Bestellnummer: 04 909 631 001, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit dem Farbstoff ResoLight
- MeltDoctor™ HRM Master Mix (Bestellnummer: 4415440, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit dem Farbstoff MeltDoctor™ HRM Dye

Die ready-to-use-Mastermixe LightCycler® 480 High Resolution Melting Master und MeltDoctor™ HRM Master Mix wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet (Angaben beziehen sich auf eine 20 µl Reaktion):

High Resolution Melting Master: 0,4 µl je Primer (jeweils 0,2 µM), 2,4 µl MgCl₂ (3 mM), 10 µl MasterMix (1X), 5 µl Probenmaterial sowie 1,8 µl Wasser.

MeltDoctor™ HRM Master Mix: 0,6 µl je Primer (je 0,3 µM), 10 µl MasterMix (1X), 1 µl Probenmaterial sowie 7,8 µl Wasser.

Die **SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain** Reaktion wurde entsprechend den in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 angegebenen Konzentrationen pipettiert, da dort ebenfalls SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain verwendet wurde. Die Angaben dort waren die Folgenden:

0,4 µl je Primer (jeweils 0,2 µM), 2,4 µl MgCl₂ (3 mM), 6 µl SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain Farbstoff (1,5 µM), 0,16 µl Taq Polymerase (0,04 u), 2 µl Taq-Buffer (1 mM), 0,8 µl dNTP (200 µM) sowie 5,84 µl Wasser.

Diese Zusammensetzung lieferte allerdings nach einem ersten Versuch nur eine sehr geringe Fluoreszenz mit unauswertbaren Ergebnissen. Daher wurde in einem zweiten Versuch mehr Farbstoff hinzugegeben (10 µl) und dementsprechend weniger Wasser (1,84 µl). Die auf diese Weise angepasste Reaktion lieferte mit den beiden anderen Reaktionen vergleichbare Werte.

Um die Eignung der verschiedenen PCR-Reagenzien zu prüfen, wurden SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain, LightCycler® 480 High Resolution Melting Master und MeltDoctor™ HRM Master Mix jeweils mit den Primerpaaren A, I und K und 16 Proben geprüft. Für alle Tests wurde das im vorangegangenen Kapitel beschriebene Touchdown-

Thermoprofil verwendet.

Die Wahl fiel hier auf die Paare A, I und K, da diese aufgrund des gleichen Thermoprofils innerhalb eines einzigen Laufes das breiteste Informationsspektrum liefern konnten.

Im Anschluss wurden die Ergebnisse nach absoluter und relativer Fluoreszenz, Form und Differenzierbarkeit der Schmelzkurven sowie Erkennung der Serovarpaare als gleiche Serovare verglichen.

6.1.1.3 Erprobung des optimalen Gesamtvolumens und des Mastermix/Proben-Verhältnisses

In einem weiteren Anpassungsschritt sollten verschiedene mögliche Verhältnisse von Mastermix und Probe geprüft werden, da für andere Testsysteme bekannt ist, dass das Gesamtvolumen bei qualitativ gleich bleibendem Ergebnis reduziert werden kann.

Hierfür wurden drei verschiedene Serovare ausgewählt und jeweils im Dreifachansatz mit einer Auswahl der Primerpaare (CR1, CR2, CR_F, I, *yohM*, sowie *shdA*) geprüft. Dies geschah jeweils mit den im Folgenden genannten Verhältnissen, allerdings lediglich mit dem High Resolution Melting Master. Der Aufbau bestand aus folgenden Verteilungen (Mastermix/Proben-DNS): 18/2 µl, 15/5 µl, 13/2 µl sowie 8/2 µl.

6.1.2 Durchführung der HRM-Analyse auf dem LightCycler® 480 und dem LightCycler® 96

Alle 100 Isolate (siehe Kapitel III.2.2) wurden wie in Kapitel III.3.2 dargestellt extrahiert und im Dreifachansatz für alle 8 Zielgene geprüft. Als Farbstoff wurde der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet. Ein Ansatz (15 µl) setzte sich hierbei wie folgt zusammen: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial. Um eine spätere Erstellung eines „Difference Plot“ zu ermöglichen, wurden zwei Referenzstämme bei jedem Lauf mitgeführt. Hierfür diente je ein Stamm der Serovare *Salmonella* Glostrup und *Salmonella* Enteritidis. Es wurden für alle Läufe die beiden gleichen Stämme verwendet. Somit konnten pro Lauf und 96-Loch-Platte 29 Stämme geprüft werden.

Nach Beendigung der Läufe wurde, um zu vermeiden, dass die Schmelzkurven von unspezifischen Produkten ausgewertet werden, ein Ct-Wert für die Amplifikationen jedes Zielgens gewählt.

Da die den Geräten beigelieferte Software (LightCycler® 480 Software 1.5 bzw. LightCycler® 96 Software 1.1) nicht imstande ist, mehr als einen Lauf simultan zu betrachten, mussten die Daten anschließend weiter bearbeitet werden, da ohne eine gleichzeitige Betrachtung kein Vergleich und keine Beurteilung aller 100 Stämme möglich war. Diese Bearbeitung wurde wie folgt durchgeführt:

- Zunächst erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software die Auswahl einer repräsentativen Schmelzkurve aus den vorhandenen drei Kurven. Als repräsentativ wurde hierbei eine Kurve angesehen, die in ihrer normalisierten Form mit mindestens einer der beiden anderen des Triplets übereinstimmte. Der Fall, dass alle Proben des Triplets drei unterschiedliche Kurven aufwiesen, trat nicht auf. Beim Eintreten dieses Falles sollte der Lauf für die entsprechende Probe wiederholt werden.
- Im Anschluss wurden die Rohdaten aller vier Läufe eines Zielgens zunächst in eine Textdatei (.txt) exportiert und über diese in Microsoft Excel geladen. Dort wurden die Rohdaten für die weitere Verarbeitung durch Stata 12 (StataCorp LP, Texas) formatiert. Diese Formatierung beinhaltete zum einen die Deletion aller nicht selektierten Kurvendaten, zum anderen wurde der Datensatz in ein für die weitere Bearbeitung notwendiges Format umgewandelt. Dies bedeutete hauptsächlich eine Probenbenennung, die in den nachfolgenden Schritten eine eindeutige Identifizierung der Probe durch das Programm ermöglichte.
- Die anschließende Bearbeitung erfolgte, wie bereits erwähnt, mit dem Programm Stata 12 (StataCorp LP, Texas). Mit diesem wurde eine Datei programmiert, mit deren Hilfe der Datensatz eingelesen und bearbeitet werden konnte. Die Bearbeitung beinhaltete zum einen die Normalisierung der Maxima bzw. Minima auf die Werte 100 bzw. 0. Hierzu wurde die Formel $f(x) = \{[x - \min(x)] / [\max(x) - \min(x)]\} \times 100$ verwendet. Des Weiteren fand auch eine Begrenzung der Werte in dem gewünschten, zu betrachtenden Temperaturbereich statt. Im Anschluss daran konnten alle gewünschten Graphen durch das Programm gezeichnet werden.
- Dies lieferte für alle 100 Serovare vergleichbare Datenpunkte, welche nun ebenfalls mit dem Programm Stata 12 als Schmelzkurve gezeichnet und ausgewertet werden konnten. Die so entstandenen Kurven wurden für die weitere Auswertung und den späteren Vergleich zu anderen Proben herangezogen.

6.1.3 Prüfung des Primerpaares FljB-1,2/1,5 für die zusätzliche Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-)

Da die Auswahl der *Salmonella*-Typhimurium-Stämme auch monophasische Isolate mit der Antigenformel (1,4,[5],12:i:-) enthielt und die Multiplex PCR II-G3 (RAJTAK et al., 2011) mit dem Primerpaar FljB-1,2/1,5 (Tabelle 14) ein Primerpaar aufweist, welches genau auf das bei dieser Variante fehlende Zielgen abzielt, wurde ausgeprüft, ob dieses Zielgen auch in der HRM-Analyse für die Differenzierung der monophasischen Variante (1,4,[5],12:i:-) verwendet werden kann. Hierzu wurden die bereits im eigentlichen Aufbau verwendeten fünf *Salmonella*-Typhimurium-Proben (1,4,[5],12:i:-) mit sechs weiteren Isolaten dieses Typs ergänzt. Diese wurden zusammen mit 28 *Salmonella*-Typhimurium-Stämmen der Antigenformel (1,4,[5],12:i:1,2) unter Verwendung des zu einer Touchdown-PCR umgewandelten Thermoprofils „A,I,K“ (III.6.1.1.1) geprüft.

6.1.4 Prüfung einer Differenzierungsmethode für die *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2)

Um auch die *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2) von den übrigen *Salmonella*-Typhimurium-Stämmen abgrenzen zu können, wurde die genetische Grundlage für die Ausprägung des O5-Antigens näher betrachtet. Bei dieser muss es sich um einen Genort handeln, bei dem eine Mutation den Verlust des O5-Antigens zur Folge hat. Ein derartiges Geschehen ist für das *oafA*-Gen beschrieben (HAUSER et al., 2011). Daher wurden die in Tabelle 21 gezeigten Proben in einer HRM-Analyse diesbezüglich geprüft.

Tabelle 21: Überblick über die für die Differenzierung der Variante O5-negativ verwendeten Proben. Die Proben 1-10 wurden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Verfügung gestellt und fanden auch in der Publikation (HAUSER et al., 2011) Verwendung. Dort wurden bereits bei acht dieser Proben Mutationen beschrieben. Auch diese werden in der Tabelle erfasst. Insgesamt wurden fünf Proben des Typs (1,4,12:i:-), fünf des Typs (1,4,12:i:1,2) sowie fünf Vergleichskontrollen mit dem Antigenchema (1,4,[5],12:i:1,2) geprüft.

Nummer	Bekannte Mutations-Loci	Typ
1	438	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)
2	638	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)
3	1758	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)
4	-	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)
5	-	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)
6	385	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)
7	406	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)
8	424	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)
9	1099	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)
10	1792	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)
11	-	S. Typhimurium (4,[5],12:i:1,2)
12	-	S. Typhimurium (4,[5],12:i:1,2)
13	-	S. Typhimurium (4,[5],12:i:1,2)
14	-	S. Typhimurium (4,[5],12:i:1,2)
15	-	S. Typhimurium (4,[5],12:i:1,2)

Wie in Abbildung 3 dargestellt handelt es sich bei den beschriebenen Mutationen allerdings nicht nur um eine, sondern um eine Vielzahl an Veränderungen (HAUSER et al., 2011).

Daher wurden insgesamt acht Primer gewählt, die dann in insgesamt fünf Kombinationen mit den Proben geprüft wurden. Diese Kombinationen wurden so gewählt, dass alle beschriebenen Mutationen mindestens durch ein Primerpaar erfasst wurden. Dies zeigt ebenfalls Abbildung 3.

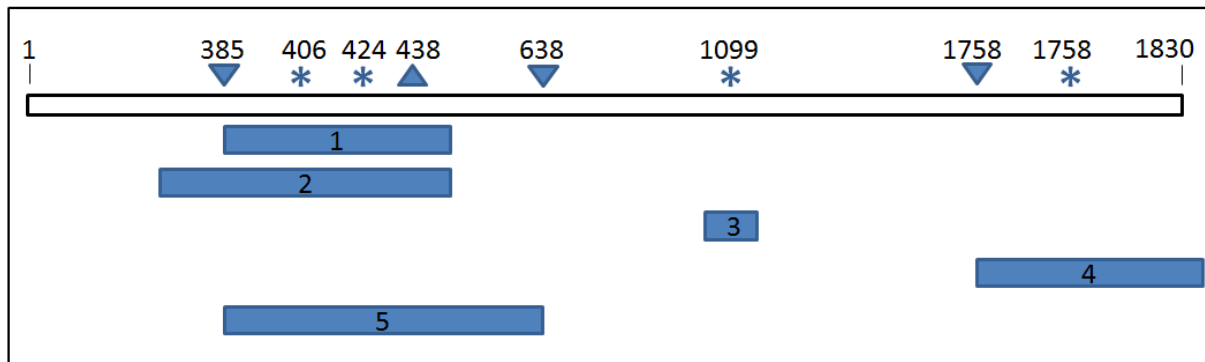


Abbildung 3: Überblick über die jeweiligen Veränderungen innerhalb des *oafA*-Gens, sowie die Lage der fünf geprüften Primerkombinationen. Die Mutationen sind durch individuelle Symbole gekennzeichnet: ∇ (Insertionen), Δ (Deletion) und * (Stopcodon).

Tabelle 22 gibt ergänzend die genaue Position der Primer sowie deren Sequenz an. Jede der Kombinationen wurde mit allen 15 Proben im Einfachansatz geprüft. Auch hier wurde das zu einer Touchdown PCR modifizierte A,I,K-Thermoprofil verwendet.

Tabelle 22: Überblick über die unterschiedlichen Primerkombinationen und die Lokalisation der beiden Primer bezogen auf die Abbildung 3. Die Sequenzen der markierten (*) Primer wurden aus der Publikation von Hauser et al. aus dem Jahr 2011 entnommen.

Nr.	Name Primer 1 (Position)	Sequenz Primer1 (5'-3')	Name Primer 2 (Position)	Sequenz Primer 2 (5'-3')
1	OafA_385_Forward (385)	TCGACTCATCAT CAGAGTTCAAC	P-1072* (459)	AATGACTAATAAA GGATATAAAATAT
2	P-439* (290)	ACGAAGCACTT AGCAAGAACG	P-1072* (459)	AATGACTAATAAA GGATATAAAATAT
3	OafA_1099_Forward (1099)	ATGCTTGTTT GTCATGTTTACA	OafA_1099_Reverse (1099)	AGCAAATATC AGGCCTCCAG
4	OafA_1758_Forward (1758)	CAATGCGCA CCTAACACCAG	OafA_1911_Reverse (1911)	GCATGCCCCA TCAGAAAAGCTA
5	OafA_385_Forward (385)	TCGACTCATCA TCAGAGTTCAAC	OafA_638_Reverse (638)	CCATTCTGGC ATTTTGTAACGT

7 Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung

7.1 Amplifikation und Probenaufbereitung für die Sequenzierung

Für die Amplifikation der zu sequenzierenden Proben wurde eine konventionelle PCR mit Hilfe eines Thermocyclers T3000 (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Diese wurde mit der Q5® High-Fidelity DNS Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) analog den Herstellerangaben in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus je 2,5 µl des Forward und Reverse Primers (je 0,5 µM), 10 µl Pufferlösung (1X), 0,5 µl Taq Polymerase (0,02 U/µl), 1 µl dNTP-Mix (200 µM), 28,5 µl Wasser und 5 µl Probenmaterial zusammen. Die Thermoprofile wurden anhand der Schmelzeigenschaften der Primer gewählt und werden bei diesen gesondert beschrieben.

Nachdem die PCR erfolgreich abgeschlossen war, wurde das entstandene Produkt in eine Gelelektrophoresekammer vom Typ Whatman Horizon 11.14 (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) gegeben. Hier wurden 5 µl des Produktes für eine Dauer von 90 Minuten, bei einer Spannung von 100 V in ein 1 %iges Gel gegeben und anschließend mit einer Bio Doc Analyze UV-Kamera (Biometra, Göttingen, Deutschland) betrachtet und dokumentiert.

Anschließend wurde unterschiedlich verfahren:

- Zeigten sich neben der gewünschten Bande, welche durch eine DNS-Leiter (Art. T918.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) identifiziert wurde, weitere Banden, so wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten. Hierzu wurde der oben beschriebene Gelelektrophorese-Schritt mit 10 µl des Produktes wiederholt und im Anschluss die Bande unter Zuhilfenahme eines Skalpell und einer UV-Lampe ausgeschnitten. Der Ausschnitt wurde nun in ein 2 ml Eppendorf Gefäß gegeben und anschließend aufgereinigt.
- Zeigte die erste Gelelektrophorese keine weiteren Banden außer der gewünschten, so wurde das Produkt direkt aufgereinigt.

Die Aufreinigung erfolgte in beiden Fällen mithilfe des QIAquick Spin Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers, jeweils für die direkte Aufreinigung von PCR-Produkten und für die Aufreinigung von aus dem Gel ausgeschnittenen PCR-Produkten.

Zuletzt wurde die aufgereinigte DNS an die Firma eurofins mwg operon (Ebersberg, Deutschland) zur Sequenzierung versandt.

7.2 Reagenzien für das High Resolution Melting

Für die Reaktionen auf den Geräten LightCycler® 96 sowie LightCycler® 480 der Firma Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde in beiden Fällen der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) als Farbstoff verwendet. Ein Ansatz (15 µl) setzte sich hierbei wie folgt zusammen: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (je 0,2 µM), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial.

Die Reaktionen auf dem Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden mit dem Farbstoff-Mastermix Type-It (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Ansatzes enthielt hier einen 1,75 µl Mix beider Primer (0,7 µM je Primer), 12,5 µl Type-It Mastermix (1X), 8,75 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial. Dies ergab ein Gesamtvolumen von 25 µl.

7.3 Differenzierung der LAH-Impfstämme

Als beiden gemeinsamer, gut beschriebener phänotypischer Marker bot sich hier die Verwendung der Rifampicin-Resistenz an. Diese ist in der Literatur (OVCHINNIKOV et al., 1981a; 1981b; 1983; LISITSYN et al., 1984; JIN & GROSS, 1988; WICHELHAUS et al., 1999; HU et al., 2002) mit einer Mutation *rpoB*-Gens assoziiert. Daher sollte dieses Gen bei den LAH-Impfstämmen auf mögliche Mutationen hin untersucht werden.

7.3.1 Sequenzierung des *rpoB*-Gens

Da das *Salmonella-rpoB*-Gen 4029 bp umfasst, wurden insgesamt sieben Primerpaare erstellt, die das gesamte Gen abdeckten. Die hieraus resultierenden Produkte variierten zwischen 578 bp und 837 bp und überlappten sich, um eine einwandfreie Sequenzierung zu gewährleisten, gegenseitig um etwa 100 bp (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Sequenzen, Produktgrößen und die Position der für die Sequenzierung des *rpoB*-Gens verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Produktgröße
RpoB1-Forward	AGATGGGTCGACTTGTCAGC	35-15 5' von <i>rpoB</i>	578 bp
RpoB 1-Reverse	ACCACGGTAAGGAATGATGC	524-543	
RpoB 2-Forward	GGAAGGCACCGTAAAAGACA	330-349	754 bp
RpoB 2-Reverse	GCTCAGACGATCGTTAGTTGG	1063-1083	
RpoB 3-Forward	GCATATCGAAGTTCCGGTTG	849-868	809 bp
RpoB 3-Reverse	TCGGGTGTACGTCTCGAACT	1638-1657	
RpoB 4-Forward	ACCCGCTGTCTGAGATTACG	1556-1575	765 bp
RpoB 4-Reverse	CCAGAGACACACATGGCATC	2301-2320	
RpoB 5-Forward	GCTAAACGTGGCGGTACTGT	2152-2171	820 bp
RpoB 5-Reverse	TGTCGAGCTTCTCAGCTTCA	2952-2971	
RpoB 6-Forward	GCGTACCTAACGGTGTCTCC	2756-2775	837 bp
RpoB 6-Reverse	GCTCTTTGATTTCCGCTTCT	3573-3592	
RpoB 7-Forward	CAAGATTAACGCCATGCTGA	3378-3397	771 bp
RpoB 7-Reverse	CGGTTTTAGTCTGCGCTTTC	100-119 3' von <i>rpoB</i>	

Letztlich wurden die Produkte des *rpoB*-Gens, wie in Kapitel III.7.1 beschrieben, amplifiziert, aufgereinigt und sequenziert. Für die Amplifikationsreaktionen konnte für alle sieben Primerpaare ein gemeinsames Thermoprofil verwendet werden. Dieses ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Thermoprofil für die Sequenzierung des *rpoB*-Gens. Für alle sieben Primerpaare wurde das gleiche Profil verwendet.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	98	00:30
Denaturierung	30	98	00:10
Annealing		51	00:20
Elongation		72	00:30
Finale Elongation	1	72	02:00
Kühlen	1	4	/

Die hieraus gewonnen Sequenzen wurden anschließend unter Verwendung der Programme Bioedit (HALL, 1999) und FASTA (PEARSON & LIPMAN, 1988) ausgewertet. Anschließend wurden die daraus gewonnen Sequenzen mit denen der NCBI-BLAST Datenbank (ALTSCHUL et al., 1990) verglichen. Bei gefundenen Mutationen sollte die entsprechende Sequenzierung mit dem jeweiligen Primerpaar wiederholt werden, um das

Ergebnis nochmals zu bestätigen.

Zuletzt wurde aus den sieben Teilstücken das komplette *rpoB*-Gen für beide Impfstämme zusammengefügt.

7.3.2 Konzipierung und Auswahl eines Primerpaares für die Differenzierung mittels High Resolution Melting

Nach dem Vergleich der jeweiligen Stämme konnte in beiden Sequenzen je eine Punktmutation im Abstand von 15 bp nachgewiesen werden. Es wurden fünf Primerkombinationen ausgewählt, welche allesamt den Bereich, in dem die beiden Mutationen gefunden worden waren, abdeckten und somit beide Mutationen auf einmal detektieren sollten. Die resultierende Produktgröße variierte zwischen 93 bp und 151 bp (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Sequenzen, Produktgrößen sowie die Lage auf dem *rpoB*-Gen für die, in der HRM geprüften, Primer zur Detektion der beiden *rpoB* Mutationen.

	Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Produktgröße
1	RpoB -SNP-1-Forward	TATGGACCAGAACAACCCGC	1542-1561	101 bp
	RpoB -SNP-1-2-4-Reverse	GAAC TTCGAAGCCTGCGC	1625-1642	
2	RpoB -SNP-2-Forward	ATTTCCGCCG CAGTGAAAG	1492-1510	151 bp
	RpoB -SNP-1-2-4-Reverse	GAAC TTCGAAGCCTGCGC	1625-1642	
3	RpoB -SNP-3-Forward	AGAACAACCCGCTGTCTGAG	1550-1569	108 bp
	RpoB -SNP-3-Reverse	TCGGGTGTACGTCTCGAACT	1638-1657	
4	RpoB -SNP-4-Forward	AGAACAACCCGCTGTCTGAGA	1550-1570	93 bp
	RpoB -SNP-1-2-4-Reverse	GAAC TTCGAAGCCTGCGC	1625-1642	
5	RpoB -SNP-5-Forward	GCTGTCTCAGTTTATGGACCAGAA	1530-1553	97 bp
	RpoB -SNP-5-Reverse	GCGTTCGCGGGTCAGA	1611-1626	

Alle Primerkombinationen wurden mit den beiden LAH-Impfstämmen und je einem *Salmonella*-Enteritidis- bzw. *Salmonella*-Typhimurium-Feldstamm im Dreifachansatz mit dem in Tabelle 26 aufgeführten Thermoprofil und dem unter III.7.2 aufgeführten Reagenzien (15 µl/Ansatz: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser, sowie 2 µl Probenmaterial) auf dem LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) geprüft. Als Thermoprofil wurde abermals das zu einer Touchdown-PCR umgewandelte A,I,K-Thermoprofil als Basis genommen. Es wurde lediglich eine variable Annealing

Temperatur gewählt, um jeden Primer bei optimalen Bedingungen prüfen zu können.

Tabelle 26: Thermoprofil für die Prüfung der fünf Primerpaare. Es wurde bei allen fünf Paaren das gleiche Profil verwendet, lediglich für das Annealing in der Amplifikation wurden unterschiedliche Werte herangezogen.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)		Zeit (mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	95		10:00
Amplifikation	45	95		00:10
		Paar 1,2,4 Paar 3 Paar 5	64-54 62-52 63-53	00:15
		72		00:10
HRM	1	95		01:00
	1	40		01:00
	1	65		00:05
	1	95		-
Kühlen	1	40		00:30

Letztlich wurde ein Primerpaar anhand der Kurvenverläufe ausgewählt und ein HRM Lauf mit den unter III.2.3 erwähnten 57 Stämmen (Tabelle 10) auf einem LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls die unter III.7.2 genannten Reagenzien (15 µl/Ansatz: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial) und das in Tabelle 27 gezeigte Thermoprofil verwendet. Dieses entspricht nun völlig dem zu einer Touchdown-PCR umgewandelten A,I,K-Thermoprofil. Zur Sicherstellung gleichwertiger Ergebnisse mit dem im Vortest (Tabelle 26) verwendeten Thermoprofil wurde ein Vergleichslauf durchgeführt. Der Vorteil des in Tabelle 27 gezeigten Thermoprofils besteht darin, dass sich somit beide Methoden (Serovar-Differenzierung und Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung) innerhalb des gleichen Laufs kombinieren lassen.

Tabelle 27: Thermoprofil für die HRM-Analyse. Dieses Profil wurde bis auf den in Tabelle 26 beschriebenen Versuch für alle HRM Läufe bei der Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung verwendet. Dieses Profil wurde gewählt, um die Möglichkeit eines gemeinsamen Thermoprofils sicher zu stellen und die Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung mit der Serovar-Differenzierung nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 kombinieren zu können.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	95	10:00
Amplifikation	35	95	00:05
		60-50	00:30
		72	00:20
HRM	1	95	01:00
	1	40	01:00
	1	65	00:05
	1	95	-

7.3.3 Gerätevergleich

Im nächsten Schritt wurde ein Vergleich mit anderen Plattformen durchgeführt. Hierzu wurde eine repräsentative Auswahl der Proben getroffen und diese auf einem LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sowie einem Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Vergleich geprüft.

Für den Lauf auf dem LightCycler® 480 wurden alle vier Impfstämme, 13 *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme und 13 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme, ausgewählt. Die *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme einhielten je zwei Stämme mit der Antigenformel $\underline{1},4,12:i:1,2$ bzw. $\underline{1},4,[5],12:i$.

Der Rotor-Gene Q Lauf wurde auch mit allen vier Impfstämmen, jedoch nur mit neun *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämmen und neun *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämmen durchgeführt. Hier beinhaltete die *Salmonella*-Typhimurium-Auswahl je einen Stamm der Antigenformeln $\underline{1},4,12:i:1,2$ bzw. $\underline{1},4,[5],12:i$. Eine Reduzierung der Isolate war aufgrund der geringeren maximalen Probenkapazität notwendig.

Einen Überblick über die verwendeten Proben zeigt Tabelle 12 in Kapitel III.2.3. Verwendet wurden für die beiden Läufe die folgenden Reagenzien:

LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland): 15 µl/Ansatz: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High

Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial.

Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland): 25 µl/Ansatz: 1,75 µl Mix beider Primer (0,7 µM je Primer), 12,5 µl Type-It Mastermix (1X), 8,75 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial.

Als Thermoprofil diente das in Tabelle 27 gezeigte Profil.

7.4 Differenzierung der IDT-Impfstämme

Hier wurden sowohl die genetischen Grundlagen der Adenin-Auxotrophie (*purA* und *purB*), als auch die der Histidin-Auxotrophie (*his*-Genkomplex) untersucht.

7.4.1 Sequenzierung der Gene *purA* und *purB*

Für die Sequenzierung von *purA* (1299 bp) und *purB* (1371 bp) wurde zunächst je ein Primerpaar erstellt. Die daraus resultierenden Produkte wurden wie unter III.7.1 beschrieben aufgereinigt, sequenziert und ausgewertet. Mit diesen Primern konnte *purB* bereits vollständig sequenziert werden, *purA* hingegen lieferte unvollständige Ergebnisse, weshalb hier noch ein weiterer Forward-Primer verwendet werden musste. Tabelle 28 zeigt das für alle Reaktionen verwendete Thermoprofil, während Tabelle 29 einen Überblick über die verwendeten Primer darstellt.

Tabelle 28: Thermoprofil für die Amplifikation der Proben, die für die *purA*- bzw. *purB*-Sequenzierung verwendet wurden. Alle Reaktionen konnten mit diesem Thermoprofil durchgeführt werden.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)	Zeit (mm:ss)
Initiale Denaturierung	1	98	00:30
Denaturierung	30	98	00:10
Annealing		67	00:20
Elongation		72	00:45
Finale Elongation	1	72	02:00
Kühlen	1	4	/

Tabelle 29: Die für die Sequenzierung des *purA*- bzw. *purB*-Gens verwendeten Primersequenzen, die resultierenden Produktgrößen und die Positionen auf den jeweiligen Genen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Produktgröße
PurA-1-Forward	GGAAAACGATTGGCTGAGCA	119-99 5' von <i>purA</i>	1505 bp
PurA-Reverse	GTGTCGGATAGCGTAATGGC	67-87 3' von <i>purA</i>	
PurA-2-Forward	TGTTGGTGACCTTTTCGACA	444-463	943 bp
PurA-Reverse	GTGTCGGATAGCGTAATGGC	67-87 3' von <i>purA</i>	
PurB-Forward	CTACTGGCAGGCATCCGT	117-135 5' von <i>purB</i>	1655 bp
PurB-Reverse	TCCTCTACAACCAGTACGCG	129-149 3' von <i>purB</i>	

7.4.2 Sequenzierung des *his*-Genkomplexes

Insgesamt erstreckt sich der *his*-Genkomplex über 7271 Basenpaare. Diese wiederum verteilen sich auf die in Abbildung 1 gezeigten acht Abschnitte. Es wurde für jedes dieser Teilstücke ein eigenes Primerpaar gewählt. Auch hier wurden, wie unter III.7.1 beschrieben, die resultierenden Produkte abermals aufgereinigt, sequenziert und ausgewertet.

hisD, *hisC*, *hisH*, *hisA*, *hisF* und *hisI* konnten bereits mit dem ersten Versuch komplett sequenziert werden. Für *hisB* hingegen war ein weiteres, für *hisG* sogar zwei weitere Primerpaare notwendig. Einen detaillierten Überblick der verwendeten Thermoprofile und Primer bieten Tabelle 30 und Tabelle 31.

Tabelle 30: Thermoprofile der Reaktionen deren Produkte anschließend für die *his*-Sequenzierung verwendet wurden. Es wurden größtenteils die gleichen Profile verwendet. Lediglich bei der Annealingtemperatur sowie der Elongationszeit wurden individuelle Werte gewählt. Dies geschah aufgrund der unterschiedlichen Primersequenzen bzw. deren unterschiedliche Produktgrößen.

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temp. (°C)		Zeit (mm:ss)	
Initiale Denaturierung	1	98		00:30	
Denaturierung	30	98		00:10	
Annealing		HisG	53	00:20	
		HisD	53		
		HisC	53		
		HisB	53		
		HisH	52		
		HisA	53		
		HisF	53		
		HisI	55		
		HisG2	55		
		HisG3	56		
HisB2		55			
Elongation		72		HisG	00:45
	HisD			01:00	
	HisC			00:45	
	HisB			00:45	
	HisH			00:30	
	HisA			00:45	
	HisF			00:45	
	HisI			00:30	
	HisG2			00:30	
	HisG3			00:15	
HisB2	00:15				
Finale Elongation	1	72		02:00	
Kühlen	1	4		/	

Tabelle 31: Die für die Sequenzierung des *his*-Genkomplexes verwendeten Primersequenzen und die resultierenden Produktgrößen sowie die Lage der Primer im *his*-Genkomplex.

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Produktgröße
HisG-Forward	ACCGACAATTGCGACCTTTT	248-227 5' von <i>hisG</i>	1491 bp
HisG-Reverse	CCGTCCGGTAATACTGTCA	1224-1243	
HisD-Forward	CAAGTGAACGCCTGGAAGAG	836-855	1764 bp
HisD-Reverse	CGTTTGTGGGTGAGCTGAA	2580-2599	
HisC-Forward	GCCTTGGGTAGCGGATTTTC	2275-2294	1394 bp
HisC-Reverse	ATCACCAGCTTAAAACCGGC	3649-3668	
HisB-Forward	CCAACTATATTCTGGCGCGG	3336-3355	1423 bp
HisB-Reverse	GTTGCGCAGTTGATCCATA	4739-4758	
HisH-Forward	TCCGCTCACTCTCTTACACG	4418-4437	930 bp
HisH-Reverse	CTTAGCCGGATCTTTAGCGC	5328-5347	
HisA-Forward	CTTTGTTACAGCTACGCGA	5000-5019	1132 bp
HisA-Reverse	CCCGCTACACAAAACGGAAT	6112-6131	
HisF-Forward	CGTCGGCCTGAAACATGTAC	5656-5675	1199 bp
HisF-Reverse	GCCTTTGGTCCATAAACGCT	6835-6854	
HisI-Forward	CAGGACGGCGTGCGTAAC	6430-6447	1000 bp
HisI-Reverse	TTGCTGGGTGGGATGATCG	139-158 3' von <i>hisI</i>	
HisG2-Forward	CCCGCCGTGACTGACAATT	179-160 5' von <i>hisG</i>	1034 bp
HisG2-Reverse	CTCTTCCAGGCGTTCACTTG	836-855	
HisG3-Forward	AGTCTTTCAGGCGATGTGTG	13 5' von <i>hisG</i> – 7 in <i>hisG</i>	497 bp
HisG3-Reverse	TCCCAGGCTTCGTCAACC	467-484	
HisB2-Forward	TGGGCATTACTGGTTTACGC	3935-3954	380 bp
HisB2-Reverse	CGCCAGACATTCATCCATCG	4295-4314	

7.4.3 Konzipierung der Primer für die Differenzierung mittels High Resolution Melting

Für die Differenzierung mittels HRM wurden Veränderungen im *his*-Genkomplex ausgewählt. Da sich die hier gefundenen Mutationen in großem Abstand zueinander befanden, wurde sowohl ein Primerpaar für die Differenzierung des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes, als auch ein Primerpaar für die des *Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes ausgewählt.

Diese Primerpaare wurden dann in einem HRM Lauf gegen die unter III.2.3 aufgelisteten Stämme (Tabelle 10) geprüft. Dies bedeutete zum einen 25 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme sowie beide *Salmonella*-Typhimurium-Impfstämme, zum anderen 28

Salmonella-Enteritidis-Feldstämme in Verbindung mit den beiden *Salmonella*-Enteritidis-Impfstämmen. Beide Läufe wurden mit den unter III.7.2 genannten Reagenzien (15 µl/Ansatz: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial) und dem in Tabelle 27 aufgezeigten Thermoprofil auf einem LightCycler® 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Details zu den verwendeten Primern sind in Tabelle 32 dargestellt.

Tabelle 32: Primersequenzen, Produktgrößen und Positionen der Primer, die für den HRM Lauf verwendet wurden um die beiden *his*-SNPs zu detektieren.

Primer	Sequenz (5'-3')	Position	Produktgröße
HisB-SNP-Forward	AGGGTGATCTCTATATCGACGA	4175-4196	80 bp
HisB-SNP-Reverse	GAGTGCCAGTTTTAATGCCTC	4234-4254	
HisH-SNP-Forward	GCGAACGTGAACTGATCGAC	4753-4772	74 bp
HisH-SNP-Reverse	CAGTTGCATCCCTAAGCAGA	4807-4826	

7.4.4 Gerätevergleich

Zuletzt sollte hier wie in Kapitel III.7.3.3 bereits beschrieben ein Vergleich verschiedener Geräte erfolgen. Hierfür wurde wiederum der LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und der Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Geprüft wurde ebenfalls die bereits in Abschnitt III.7.3.3 beschriebene Auswahl. Dies bedeutete für den Lauf auf dem LightCycler® 480 alle vier Impfstämme, 13 *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme und 13 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme.

Für den Rotor-Gene Q Lauf wurden alle vier Impfstämme, neun *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme und neun *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme verwendet.

Die Auswahl enthielten für die *Salmonella*-Typhimurium-Proben zwei (LightCycler® 480) bzw. einen (Rotor-Gene Q) *Salmonella*-Typhimurium-Stamm mit den Antigenformeln 1,4,12:i:1,2 und 1,4,[5],12:i.

Einen Überblick über die verwendeten Proben zeigt Tabelle 12 in Kapitel III.2.3. Verwendet wurden für die beiden Läufe die folgenden Reagenzien:

LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland): 15 µl/Ansatz: je 0,3 µl des Forward bzw. Reverse Primers (0,2 µM je Primer), 1,8 µl MgCl₂ (3mM), 7,5 µl High

Resolution Melting Master (1X), 3,1 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial.

Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland): 25 µl/Ansatz: 1,75 µl Mix beider Primer (0,7 µM je Primer), 12,5 µl Type-It Mastermix (1X), 8,75 µl Wasser sowie 2 µl Probenmaterial.

Als Thermoprofil diente das in Tabelle 27 gezeigte Profil.

IV ERGEBNISSE

1 SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011

Der Aufbau der SYBR-Green Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 bestand aus insgesamt drei Multiplex PCRs (PCR I, PCR II-G1 und PCR- IIG3) bestehen aus je fünf (PCR I) bzw. je drei (PCR II-G1 und PCR- IIG3) Primerpaaren. Diese Primerpaare sollten in der jeweiligen PCR, Produkte mit spezifischen Schmelzpunkten hervorbringen. Anhand dieser Schmelzpunkte, in Kombination der Ergebnisse aller drei Multiplex PCRs, sollte dann ein Schema für eine Differenzierung der Proben erstellt werden.

Es wurden 210 Isolate (31 verschiedene Serovare) in allen drei PCRs geprüft. Die Ergebnisse wurden anschließend in Excel-Tabellen (Anhang 1-3) sowie einem Übersichtsschema (Anhang 4) festgehalten. Auffällig war eine generelle Verschiebung der Schmelzpunkte im Vergleich zu den in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 beschriebenen um ~2 °C. Im Folgenden werden die Ergebnisse für jede Multiplex-PCR einzeln dargestellt:

1.1 PCR I

Die PCR I war aus insgesamt fünf Primerpaaren aufgebaut (siehe auch Tabelle 14). Diese müssen gesondert betrachtet werden:

Drei dieser Primerpaare (FliC-i, FliC/FljB-1 und FliC-g) lieferten Produkte, die gut voneinander durch den Schmelzpunkt-Unterschied differenziert werden konnten. Die Produkte der beiden anderen Primerpaare FloR und Sdr hingegen überschneiden sich in ihren Schmelzpunktbereichen (siehe rote Markierung in Tabelle 33).

Weitere Erkenntnisse zeigten sich bei der Gelelektrophorese. Auch hier lieferten FliC/FljB-1 und FliC-g Produkte, die gut voneinander durch einen deutlichen Größenunterschied differenziert werden konnten. Anders verhielt es sich bei FliC-i, FloR und Sdr, die jeweils nur ein Basenpaar Unterschied aufwiesen (siehe gelbe Markierung in Tabelle 33). Aufgrund der Undifferenzierbarkeit der Produkte von FloR und Sdr mussten die Ergebnisse dort in Singleplex Läufen bestätigt werden.

Eine zusätzliche Auffälligkeit zeigte das Sdr-Produkt. Dieses scheint sehr instabil, da sich im Gel nur Banden zeigten, wenn die Elektrophorese spätestens am folgenden Tag durchgeführt wurde. Solange man dies jedoch beachtete, erhielt man auch hier ein gutes Ergebnis.

Tabelle 33: Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen sowie Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR I für die jeweiligen Zielgene. Hervorgehoben sind die Überschneidung der Schmelzpunkte bei FloR und Sdr (rot) sowie die elektrophoretisch nicht zu unterscheidenden Amplifikatgrößen der Produkte von FloR, Sdr und FliC-i (gelb).

Primer	FloR	Sdr	FliC-i	FliC/FliB-1	FliC-g
Schmelzpunkt in °C (eigene Untersuchung)	86,9	86,4 - 88,5	82,8 - 84,9	79,2 - 81,4	80,5 - 82,9
Schmelzpunkt in °C (Rajtak et al., 2011)	85,1	84,5	81,2 - 81,8	77,4 - 78,9	78,9 - 79,3
Produktgröße	142 bp	144 bp	143 bp	92 bp	130 bp

1.2 PCR II-G1

Sie bestand aus drei Primerpaaren (siehe auch Tabelle 14), deren Produkte anhand der Schmelzpunkte gut zu unterscheiden waren. Auch die Gelelektrophorese lieferte eindeutige Ergebnisse, da die Größe der drei möglichen Produkte gut von einander zu unterscheiden war (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen sowie die Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR II-G1 für die jeweiligen Zielgene.

Primer	FliC-d	FliC-r,i	FliC-b
Schmelzpunkt in °C (eigene Untersuchung)	78,5 - 79,3	80,2 - 81,3	83,2 - 83,6
Schmelzpunkt in °C (Rajtak et al., 2011)	77	79,1	81,7
Produktgröße	136 bp	111 bp	148 bp

1.3 PCR II-G3

Auch die PCR II-G3 bestand aus insgesamt drei Primerpaaren. Die 67 Isolate des Serovars *Salmonella* Typhimurium zeigten hier eine starke Varianz. Es fanden sich Ergebnisse mit nur einem Produkt (bei 31 der insgesamt 67 Stämme), zwei Produkten (22 Stämme) oder gar keinem Produkt (14 Stämme). Diese Gegebenheit wird in Tabelle 35 durch drei Beispiele verdeutlicht. Alle Stämme, die überhaupt keine Amplifikation zeigten, wurden als *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) durch Seroagglutination bestätigt.

Tabelle 35: Darstellung der möglichen Produkt-Kombinationen. Gezeigt werden die Schmelzpunkte von drei, beispielhaft gewählten, *Salmonella* Typhimurium Isolaten in der PCR II-G3.

Serovar	Spv	FljB(1,2), FljB(1,5)	FljB(z6)	ct
S. Typhimurium	Negativ	82,5 °C	Negativ	21,09
S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	Negativ	Negativ	Negativ	31.73
S. Typhimurium	78,7 °C	82,6 °C	Negativ	19.76

Betrachtet man die Reaktion in ihrer Gesamtheit, so lagen die Schmelzpunkte aller drei Produkte dicht beisammen (siehe Tabelle 36). Hier war eine sichere Unterscheidung nur mit Hilfe der Gelelektrophorese möglich.

Diese lieferte eindeutige Ergebnisse, da die hier möglichen Produkte gut voneinander abzugrenzen waren. Jedoch zeigte sich bei *Salmonella* Enteritidis (wie auch schon bei der PCR I) wieder das Problem, dass nur sehr frische Proben eine Bande im Gel ergaben.

Tabelle 36: Vergleich der publizierten Schmelzpunkte mit denen der eigenen Untersuchungen sowie die Produktgrößen der Amplifikate bei der Multiplex PCR II-G3 für die jeweiligen Zielgene.

Primer	Spv	FljB-1,2/1,5	FljB-z6
Schmelzpunkt in °C (eigene Untersuchung)	78,5 - 81,3	81,2 - 84,8	80,2 - 81,3
Schmelzpunkt in °C (Rajtak et al., 2011)	76,6	78,4	80,6
Produktgröße	80 bp	112 bp	149 bp

Ein weiteres Ergebnis der PCR II-G3 war die mögliche Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung des IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes, welcher im Unterschied zu den Feldstämmen eine charakteristische, schwache Kurve aufwies (siehe Abbildung 4). Diese zeigte sich im Laufe des Versuchs auch bei einem *Salmonella*-Enteritidis-Isolat von 2005, welches darauf hin durch die konventionelle Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung (IDT *Salmonella* Diagnostikum) als Impfstamm bestätigt werden konnte.

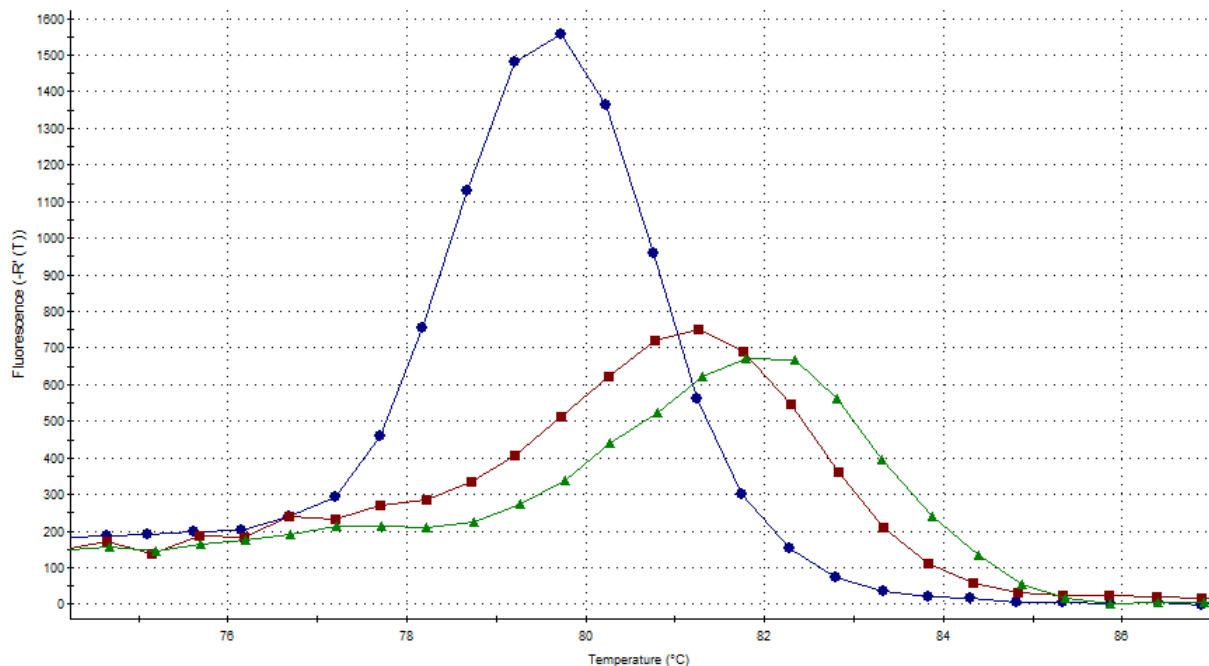


Abbildung 4: Ein *Salmonella*-Enteritidis-Feldstamm (blau) im Vergleich zu den beiden Impfstämmen (rot: Impfstamm isoliert aus Sockentupfern von Hühnern (Isolierungsjahr: 2005), grün: IDT *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm). Die Abbildung wurde der zugehörigen Software MxPro v. 4.10 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) entnommen.

Alle Ergebnisse wurden zusammengefasst und das Auswertungsschema aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 (Tabelle 13) wurde erweitert (Anhang 4). Die Erweiterung konnte aufgrund der Prüfung aller Proben mit allen drei Multiplex-PCRs bewerkstelligt werden. Dadurch konnten die Serovare *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Kottbus und *Salmonella* Virchow, die in beiden Versuchsaufbauten verwendet wurden, genauer definiert werden. Außerdem wurden die Serovare *Salmonella* Abony, *Salmonella* Blockley, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Glostrup, *Salmonella* Isangi, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Schleissheim, *Salmonella* Schwarzengrund sowie *Salmonella* ssp. IIIb erstmalig in diesem Differenzierungsschema geprüft.

Des Weiteren konnten die folgenden Serovare eindeutig als diese identifiziert werden: *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella*-Typhimurium-monophasische-Variante (1,4,[5],12:i:-), *Salmonella* Subspezies IIIb sowie *Salmonella* Enteritidis.

Zusätzlich war die Identifizierung des IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes möglich.

2 HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

Der Aufbau der HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 bestand aus acht Primerpaaren welche auf unterschiedliche, für eine HRM-Analyse geeignete, Genregionen ausgerichtet waren. Dieser prinzipielle Aufbau sollte für die eigene Untersuchung zunächst optimal angepasst und im Anschluss mit eigenen Stämmen durchgeführt werden. Hierbei sollten 100 Proben mit allen acht Primerpaaren geprüft und anhand der durch die jeweilige Zusammensetzung der DNS unterschiedlichen Schmelzkurvenformen und Schmelzkurvenverschiebungen in Gruppen eingeteilt werden.

2.1 Ergebnisse der vorhergegangenen Tests und Anpassungen

2.1.1 Farbstoffvergleich

Ziel des Farbstoffvergleichs war, die für die HRM-Analyse durch das LightCycler®-System am besten geeigneten Reagenzien zu bestimmen. Dazu wurden die Reagenzien MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) anhand der Zielgene A, I und K verglichen.

Bei den Ergebnissen für Zielgen A fiel MeltDoctor™ HRM Master Mix sowohl durch einen unsteten Schmelzkurvenverlauf als auch durch niedrige Fluoreszenzwerte auf. Die unstete Kurvenform zeigt sich in den folgenden Abbildungen gut im Temperaturbereich von 76 °C. Vergleicht man hier die Kurven von MeltDoctor™ HRM Master Mix mit denen der anderen beiden Reagenzien, zeigt sich deutlich ein zackenförmiger, unspezifischer Fluoreszenzanstieg in diesem Bereich. Dem gegenüber stehen die beiden anderen Mastermix-Varianten, welche in diesem Bereich eine ähnliche Schmelzkurve aufwiesen. Der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master hebt sich allerdings durch seine deutlich höhere relative Fluoreszenzstärke (ΔR) hervor. Bei SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain war diese auf einem ähnlichen Niveau wie die von MeltDoctor™ HRM Master Mix. Weiterhin auffällig war der deutlich frühere Abfall der Schmelzkurve bei MeltDoctor™ HRM Master Mix.

Eine Übersicht bietet Abbildung 5.

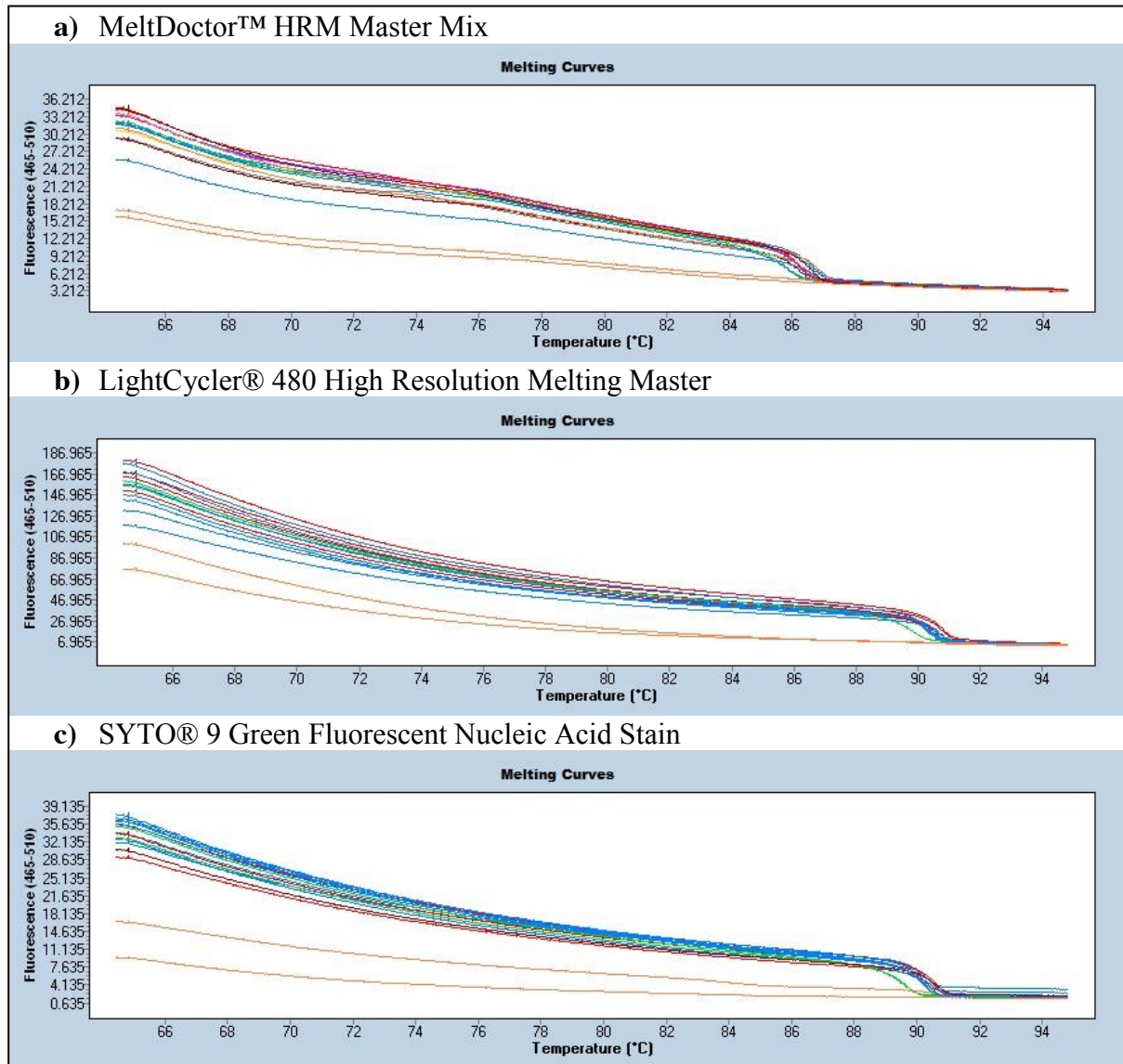


Abbildung 5: Farbstoffvergleich bei Zielgen A. Unterschiede finden sich bei einem Vergleich der Temperaturregion um 76 °C sowie bei einem Vergleich der absoluten und relativen Fluoreszenzstärken (ΔR). Die Abbildung wurde aus dem mitgelieferten Softwareprogramm LightCycler® 480 SW 1.5 übernommen.

Auch bei Zielgen I zeigte MeltDoctor™ HRM Master Mix die bereits erwähnten unsteten, unspezifischen Fluoreszenzanstiege und eine schwache absolute und relative Fluoreszenz. Die beiden anderen Mastermixe zeigten bei fast allen Proben ähnliche Fluoreszenzstärken. Allerdings zeigten zwei Proben bei SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain eine deutlich höhere Fluoreszenz als die übrigen.

Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 6 wieder.

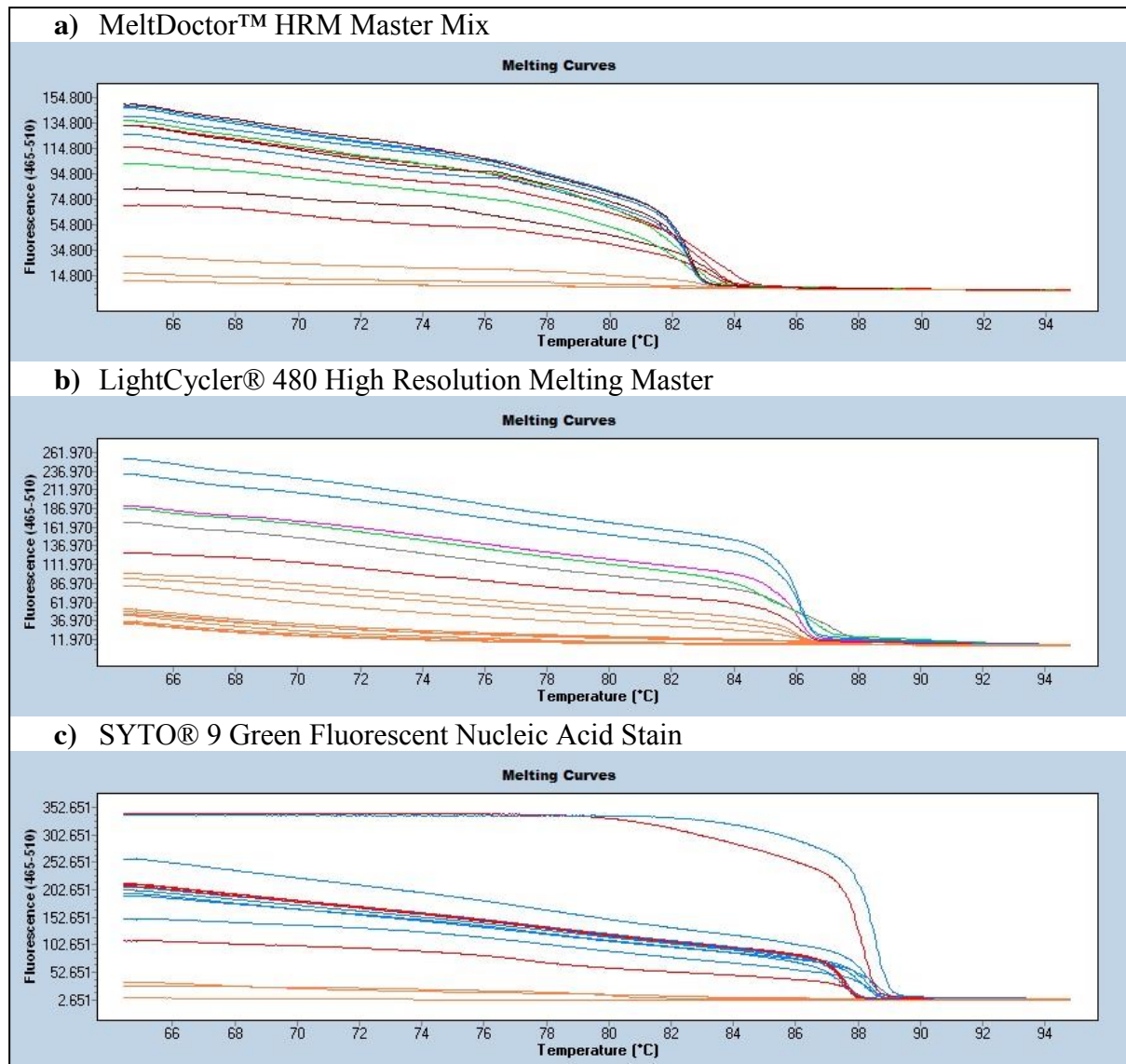


Abbildung 6: Farbstoffvergleich bei Zielgen I. MeltDoctor™ HRM Master Mix zeigt neben einen unsteten Kurvenverlauf im Bereich von 76 °C auch die niedrigste absolute und relative Fluoreszenz. SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain zeigt für zwei Proben sehr hohe Fluoreszenzstärken.

Auch im Fall des dritten Zielgens K spiegelten sich die Ergebnisse der Zielgene A und I wieder. MeltDoctor™ HRM Master Mix zeigte wiederum den gezackten Kurvenverlauf und die niedrigsten absoluten und relativen Fluoreszenzwerte. SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain wies abermals eine Probe mit deutlich stärkerer Fluoreszenz auf. Die absolute und relative Fluoreszenz bei LightCycler® 480 High Resolution Melting Master war, abgesehen von der einen erwähnten Probe von SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain, die höchste für Zielgen K (Abbildung 7).

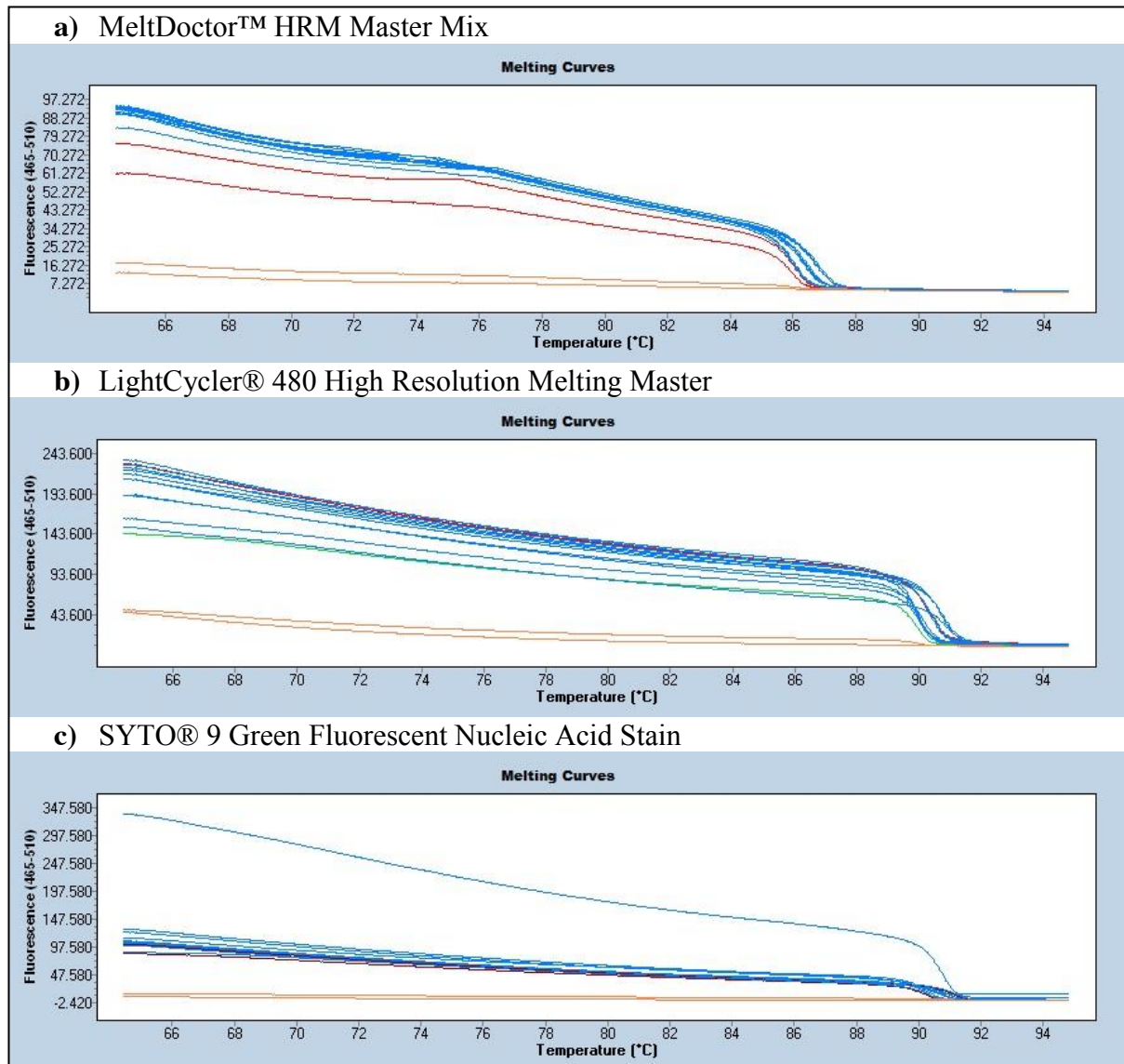


Abbildung 7: Farbstoffvergleich bei Zielgen K. MeltDoctor™ HRM Master Mix zeigt neben einen unsteten Kurvenverlauf im Bereich von 76 °C die niedrigste absolute und relative Fluoreszenz. SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain zeigt für eine Probe sehr hohe Fluoreszenzstärken.

Letztendlich fiel die Wahl auf den High Resolution Melting Master, da dieser die besten Ergebnisse bezüglich der absoluten und relativen Fluoreszenzstärke sowie der Kurvenverläufe bot.

2.1.2 Erprobung des optimalen Gesamtvolumens und des Mastermix/Proben-Verhältnisses

Um das optimale Gesamtvolumen und Mastermix/Proben-Verhältnis für die HRM-Analyse zu bestimmen, wurden verschiedene Ansätze mit jeweils einem Isolat der Serovare *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Glostrup im Dreifachansatz geprüft.

Beim Mastermix/Proben-Verhältnis 15/5 µl handelte es sich um das vom Hersteller angegebene Verhältnis. Hier lieferten aber die wenigsten Triplets (10 von 18 Ansätzen) übereinstimmende Kurven. 14 Triplets konnten mit dem kleinsten Mastermix/Proben-Verhältnis 8/2 µl identifiziert werden. Dennoch waren dies deutlich weniger als bei den beiden Reaktionsansätzen 18/2 µl und 13/2 µl. Diese lieferten vergleichbare Ergebnisse (es konnten 16 bzw. 17 von möglichen 18 Triplets identifiziert werden). Aufgrund des marginal besseren Ergebnisses und der höheren Mastermix-Ersparnis wurde letztlich das Verhältnis 13/2 µl gewählt. Einen Überblick liefert Tabelle 37.

Tabelle 37: Anpassung des Reaktionsvolumens. Geprüft wurden pro Serovar drei Proben und deren Erkennung als Triplets für jeweils die Zielgene CR1, CR2, *shdA*, *yohM*, I und CR_F. Es wurde in erfolgreiche Erkennung als Triplett(✓) und nicht erfolgreiche Erkennung (✗) unterschieden. Der letzte Teil der Tabelle zeigt für jedes Verhältnis das Gesamtergebnis aller erkannten Triplets (der insgesamt möglichen 18).

Zielgen CR1:				Zielgen I:			
Ver- hältnis	Serovar			Ver- hältnis	Serovar		
	S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup		S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup
15/5	✗	✗	✓	15/5	✗	✗	✗
18/2	✓	✓	✓	18/2	✓	✓	✓
13/2	✓	✓	✓	13/2	✓	✓	✓
8/2	✓	✓	✓	8/2	✗	✗	✓
Zielgen CR2:				Zielgen <i>yohM</i> :			
Ver- hältnis	Serovar			Ver- hältnis	Serovar		
	S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup		S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup
15/5	✓	✓	✓	15/5	✓	✓	✓
18/2	✓	✓	✓	18/2	✗	✓	✓
13/2	✓	✓	✓	13/2	✗	✓	✓
8/2	✓	✓	✓	8/2	✓	✗	✓
Zielgen <i>shdA</i> :				Zielgen CR_F:			
Ver- hältnis	Serovar			Ver- hältnis	Serovar		
	S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup		S. Typhimurium	S. Enteritidis	S. Glostrup
15/5	✓	✗	✗	15/5	✓	✗	✓
18/2	✗	✓	✓	18/2	✓	✓	✓
13/2	✓	✓	✓	13/2	✓	✓	✓
8/2	✓	✓	✓	8/2	✓	✗	✓
Gesamt:							
Verhältnis				Erkannte Triplets			
15/5				10/18			
18/2				16/18			
13/2				17/18			
8/2				14/18			

2.2 Durchführung der HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 mit dem LightCycler® 96

Im Anschluss an die Anpassungen des Protokolls wurden 100 ausgewählte Proben mit allen acht Zielgenen aus der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 auf dem LightCycler® 96 überprüft. Hierauf wurden die Schmelzkurven aller 100 Proben für jedes Zielgen gezeichnet und die Proben anhand des Schmelzkurvenverlaufs und der Schmelzkurvenverschiebung visuell in Gruppen eingeteilt.

Die Graphen in diesem Kapitel zeigen jeweils die Proben farblich markiert nach ihrem jeweiligen Serovar (Graphen auf der linken Seite) sowie eine farbliche Sortierung nach den unterschiedlichen Kurvenverläufen (Graphen auf der rechten Seite). Die Nummerierung der Gruppen erfolgte willkürlich. Die Linienfarbe nach Einteilung in die jeweiligen Kurvencharakteristika (rechter Graph) ist identisch mit der Farbe für die jeweiligen Gruppen in den Tabellen. Außerdem wurde, um zu vermeiden, dass die Schmelzkurven von unspezifischen Produkten ausgewertet wurden, ein Ct-Wert für die Amplifikationen jedes Zielgens gewählt.

2.2.1 Zielgen A

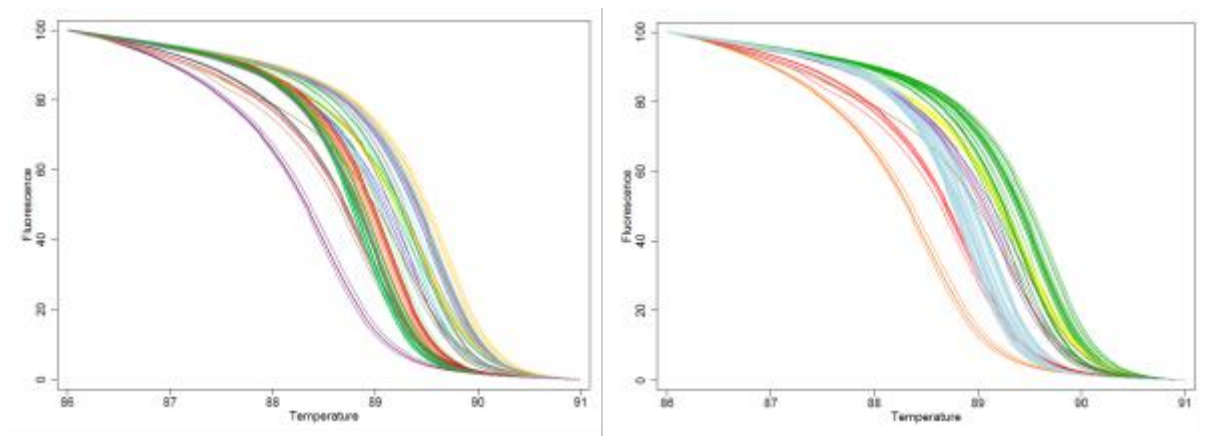


Abbildung 8: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen A, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

Die untersuchten 100 Isolate (21 Serovare) konnten in sieben Gruppen eingeteilt werden, wobei sich die Serovare *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Rissen sowie *Salmonella* Senftenberg in je zwei Gruppen aufteilten (Tabelle 38). Alle Serovare zeigten eine gute Amplifikation und konnten eindeutig als positive Proben gewertet werden. Als Ct-Wert wurde ein Threshold von 0,5 bei Zyklus 25 festgesetzt.

Tabelle 38: Gruppenschema für das Zielgen A. Einordnung der Serovare in verschiedene Gruppen anhand des Kurvenverlaufs und Kurvenverschiebungen. Die Gruppenvarianz gibt an, auf wie viele unterschiedliche Gruppen sich die Proben eines Serovars verteilen.

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen A										
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe							Gruppenvarianz	
		1	2	3	4	5	6	7		
S. Anatum	1					1			1	
S. Blockley	4					4			1	
S. Bredeney	10					1		9	2	
S. Choleraesuis	1					1			1	
S. Derby	3					1		2	2	
S. Dublin	6					6			1	
S. Enteritidis	14				14				1	
S. Enteritidis (Impfstamm)	2				2				1	
S. Give	2						2		1	
S. Glostrup	1					1			1	
S. Hadar	5				5				1	
S. Infantis	5	5							1	
S. Isangi	4					4			1	
S. Lexington	2					2			1	
S. Livingstone						3			1	
S. Montevideo	3		1						2	
				2						
S. Ohio	3		3						1	
S. Rissen	4					3			2	
							1			
S. Schwarzengrund	2						2		1	
S. Senftenberg	3		2						2	
						1				
S. Virchow	2					2			1	
S. Typhimurium	18				18				1	
S. Typhimurium (Impfstamm)	2				2				1	

2.2.2 Zielgen I

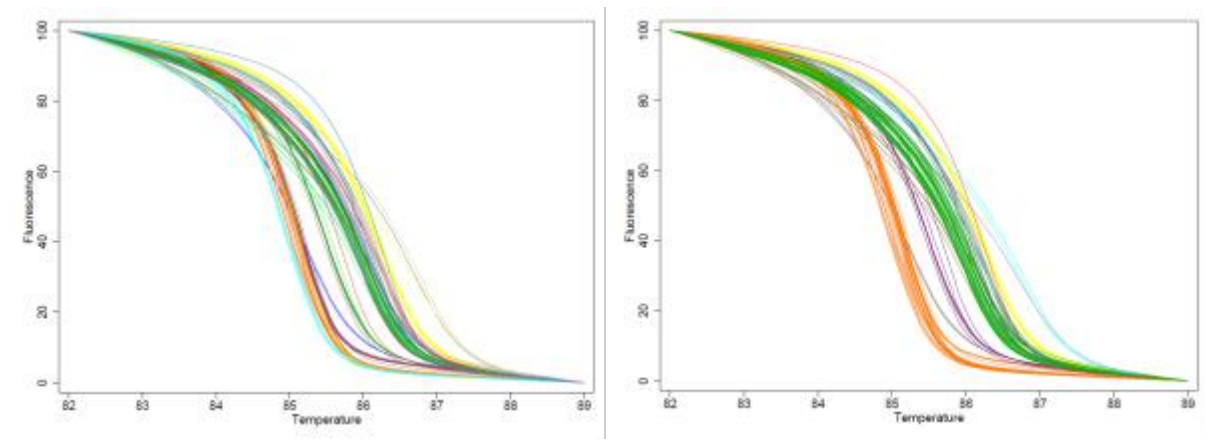


Abbildung 9: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen I, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

Alle Stämme konnten in insgesamt zehn Gruppen unterschieden werden. Die Gruppenvarianz betrug maximal zwei Gruppen (siehe Tabelle 39). Der Ct-Cutoff wurde bei einem Threshold von 0,5 bei Zyklus 30 angesetzt. Die Amplifikation war bei allen Proben gut.

Tabelle 39: Gruppenschema für das Zielgen I. Einordnung der Serovare in verschiedene Gruppen anhand der Kurvenverläufe und Kurvenverschiebungen. Die Gruppenvarianz gibt an, auf wie viele unterschiedliche Gruppen sich die Proben eines Serovars verteilen.

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen I												
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe										Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
S. Anatum	1										1	1
S. Blockley	4			4								1
S. Bredeney	10							9			1	2
S. Choleraesuis	1				1							1
S. Derby	3		2									2
S. Dublin	6					6						1
S. Enteritidis	14	14										1
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2										1
S. Give	2	1										2
S. Glostrup	1			1								1
S. Hadar	5	5										1
S. Infantis	5	5										1
S. Isangi	4	4										1
S. Lexington	2	2										1
S. Livingstone	3				3							1
S. Montevideo	3		1									2
S. Ohio	3					3						1
S. Rissen	4						3				1	2
S. Schwarzengrund	2						2					1
S. Senftenberg	3			1								2
S. Virchow	2					1						2
S. Typhimurium	18					1						1
S. Typhimurium (Impfstamm)	2					2						1

2.2.3 Zielgen K

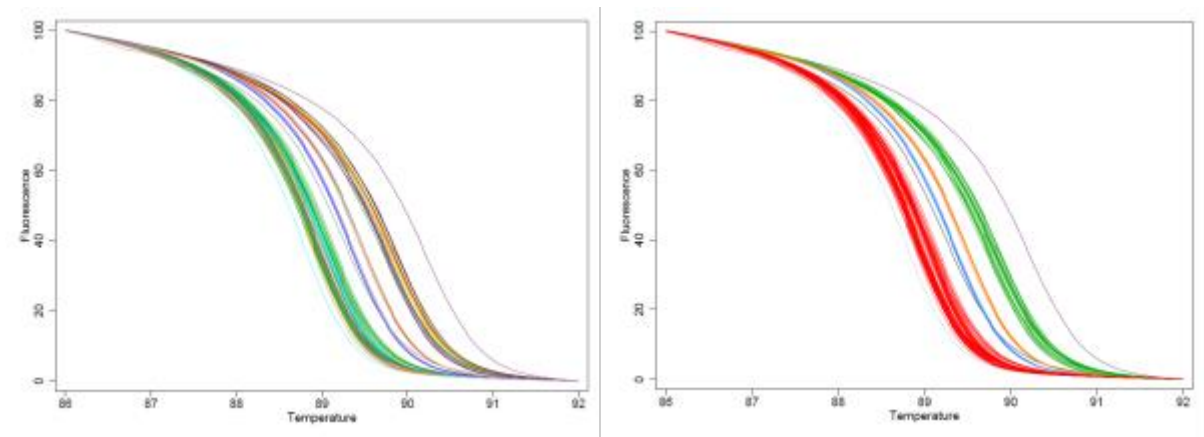


Abbildung 10: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen K, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

Mit Hilfe von Zielgen K konnten die untersuchten Stämme in sieben Gruppen eingeteilt werden. Der Ct-Wert belief sich auf einen Threshold von 0,5 bei Zyklus 25. Die Amplifikation verlief für alle Proben eindeutig positiv (siehe Tabelle 40).

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen K									
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe							Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	
S. Anatum	1	1							1
S. Blockley	4	4							1
S. Bredeney	10	9 1							2
S. Choleraesuis	1	1							1
S. Derby	3	3							1
S. Dublin	6	6							1
S. Enteritidis	14	14							1
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2							1
S. Give	2	2							1
S. Glostrup	1	1							1
S. Hadar	5	5							1
S. Infantis	5	4 1							2
S. Isangi	4	4							1
S. Lexington	2	2							1
S. Livingstone	3	3							1
S. Montevideo	3	1 2							2
S. Ohio	3	3							1
S. Rissen	4	3 1							2
S. Schwarzengrund	2	2							1
S. Senftenberg	3	3							1
S. Virchow	2	2							1
S. Typhimurium	18	18							1
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	2							1

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen K									
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe							Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	
S. Anatum	1	1							1
S. Blockley	4	4							1
S. Bredeney	10	9 1							2
S. Choleraesuis	1	1							1
S. Derby	3	3							1
S. Dublin	6	6							1
S. Enteritidis	14	14							1
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2							1
S. Give	2	2							1
S. Glostrup	1	1							1
S. Hadar	5	5							1
S. Infantis	5	4 1							2
S. Isangi	4	4							1
S. Lexington	2	2							1
S. Livingstone	3	3							1
S. Montevideo	3	1 2							2
S. Ohio	3	3							1
S. Rissen	4	3 1							2
S. Schwarzengrund	2	2							1
S. Senftenberg	3	3							1
S. Virchow	2	2							1
S. Typhimurium	18	18							1
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	2							1

2.2.4 Zielgen *yohM*

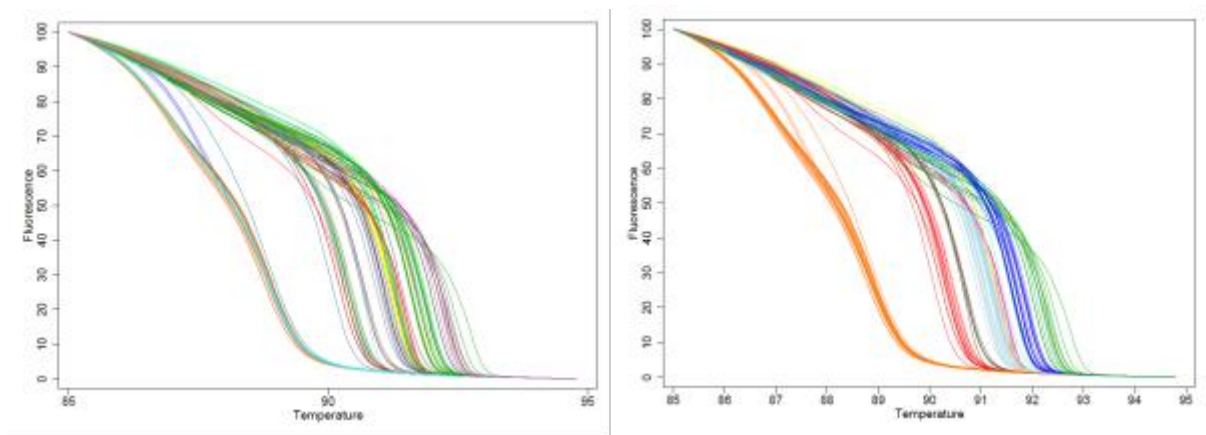


Abbildung 11: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen *yohM*, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

yohM teilte sich anhand der unterschiedlichen Kurvenverläufe in zehn Gruppen auf (Tabelle 41). Für den Ct-Wert sollte bei Zyklus 25 mindestens der Threshold von 0,5 überschritten werden.

Tabelle 41: Gruppenschema für das Zielgen *yohM*. Einordnung der Serovare in verschiedene Gruppen anhand der Kurvenverläufe und Kurvenverschiebungen. Die Gruppenvarianz gibt an, auf wie viele unterschiedliche Gruppen sich die Proben eines Serovars verteilen.

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen <i>yohM</i>											
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe									Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
S. Anatum	1				1						1
S. Blockley	4		4								1
S. Bredeney	10		1			9					2
S. Choleraesuis	1			1							1
S. Derby	3	2			1						2
S. Dublin	6			2		4					2
S. Enteritidis	14	14									1
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2									1
S. Give	2			1			1				2
S. Glostrup	1						1				1
S. Hadar	5							5			1
S. Infantis	5				4					1	2
S. Isangi	4			1			3				2
S. Lexington	2			2							1
S. Livingstone	3							3			1
S. Montevideo	3				3						1
S. Ohio	3			3							1
S. Rissen	4	1		3							2
S. Schwarzengrund	2			1			1				2
S. Senftenberg	3		3								1
S. Virchow	2		1				1				2
S. Typhimurium	18			2		3				13	3
S. Typhimurium (Impfstamm)	2			2							1

2.2.5 Zielgen *shdA*

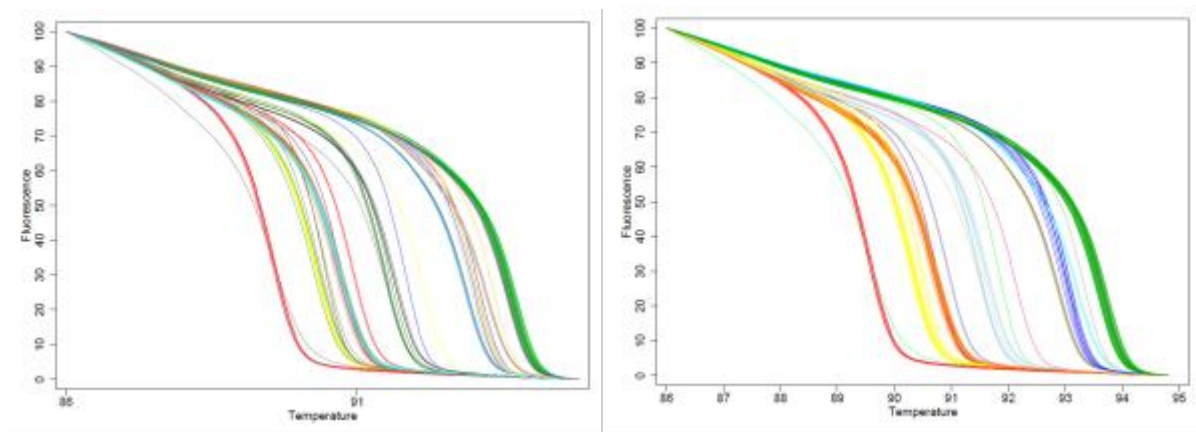


Abbildung 12: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen *shdA*, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

shdA war variantenreich und unterteilte alle geprüften 21 Serovare in 15 unterschiedliche Gruppen (Tabelle 42). Für den Ct Wert wurde der Threshold von 0,4 bei Zyklus 25 festgesetzt.

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen <i>shdA</i>															
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe													Varianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
<i>S. Anatum</i>	1	1													1
<i>S. Blockley</i>	4	4													1
<i>S. Bredeney</i>	10	9 1													2
<i>S. Choleraesuis</i>	1	1													1
<i>S. Derby</i>	3	1 2													2
<i>S. Dublin</i>	6	6													1
<i>S. Enteritidis</i>	14	1 4													1
<i>S. Enteritidis</i> (Impfstamm)	2	2													1
<i>S. Give</i>	2	1 1													2
<i>S. Glostrup</i>	1	1													1
<i>S. Hadar</i>	5	5													1
<i>S. Infantis</i>	5	1 4													2
<i>S. Isangi</i>	4	3 1													2
<i>S. Lexington</i>	2	2													1
<i>S. Livingstone</i>	3	3													1
<i>S. Montevideo</i>	3	3													1
<i>S. Ohio</i>	3	3													1
<i>S. Rissen</i>	4	4													1
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	2													1
<i>S. Senftenberg</i>	3	2 1													2
<i>S. Virchow</i>	2	2													1
<i>S. Typhimurium</i>	18	1 8													1
<i>S. Typhimurium</i> (Impfstamm)	2	2													1

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen <i>shdA</i>																		
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe																Varianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	neg.	
S. Anatum	1	1																1
S. Blockley	4	4																1
S. Bredeney	10	9 1																2
S. Choleraesuis	1	1																1
S. Derby	3	1 2																2
S. Dublin	6	6																1
S. Enteritidis	14	1 4																1
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2																1
S. Give	2	1 1																2
S. Glostrup	1	1																1
S. Hadar	5	5																1
S. Infantis	5	1 4																2
S. Isangi	4	3 1																2
S. Lexington	2	2																1
S. Livingstone	3	3																1
S. Montevideo	3	3																1
S. Ohio	3	3																1
S. Rissen	4	4																1
S. Schwarzengrund	2	2																1
S. Senftenberg	3	2 1																2
S. Virchow	2	2																1
S. Typhimurium	18	1 8																1
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	2																1

2.2.6 Zielgen CR1

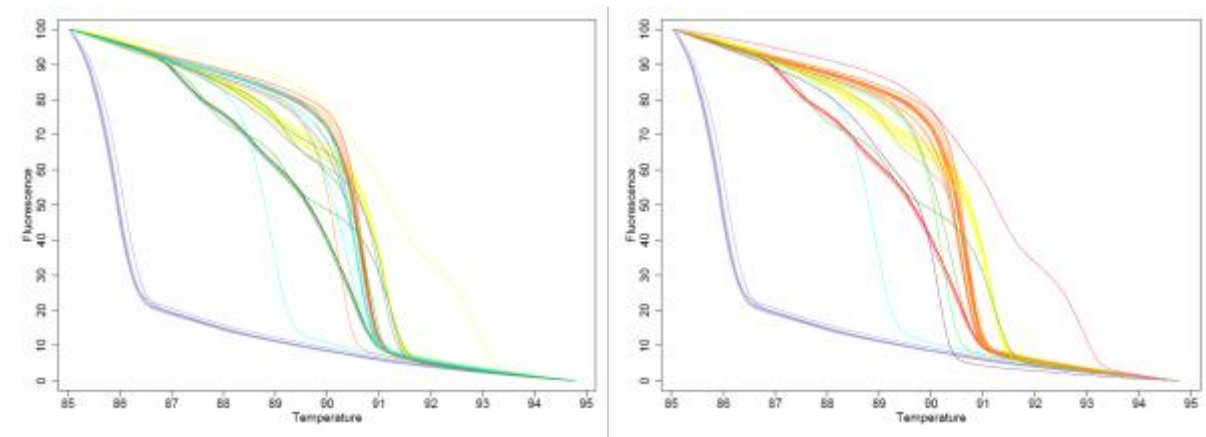


Abbildung 13: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen CR1, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

CR1 lieferte von allen gewerteten Zielgenen die meisten negativen Proben. Diese konnten deutlich anhand des Ct-Wertes bestimmt werden. Alle 21 Serovare wurden in zehn Gruppen eingeteilt, dazu kam eine eigene Gruppe für die negativen Ergebnisse (Tabelle 43). Als Ct-Wert wurde ein Threshold von 0,4 bei Zyklus 25 vorausgesetzt.

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen CR1														
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe												Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	neg		
S. Anatum	1	1												1
S. Blockley	4	4												1
S. Bredeney	10	9 1												2
S. Choleraesuis	1	1												1
S. Derby	3	3												1
S. Dublin	6	6												1
S. Enteritidis	10	1 2 1 1												3
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2												1
S. Give	2	1 1												2
S. Glostrup	1	1												1
S. Hadar	5	5												1
S. Infantis	5	5												1
S. Isangi	4	4												1
S. Lexington	2	2												1
S. Livingstone	3	3												1
S. Montevideo	3	3												1
S. Ohio	3	3												1
S. Rissen	4	2												1
S. Schwarzengrund	2	1 1												2
S. Senftenberg	3	3												1
S. Virchow	2	2												1
S. Typhimurium	18	1 1 16												3
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	2												1

LIGHTCYCLER® 96 - Zielgen CR1													
Serovar	Gesamt	Anzahl pro Gruppe											Gruppenvarianz
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	neg	
S. Anatum	1	1											1
S. Blockley	4	4											1
S. Bredeney	10	9 1											2
S. Choleraesuis	1	1											1
S. Derby	3	3											1
S. Dublin	6	6											1
S. Enteritidis	10	1 2 1 1											3
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	2											1
S. Give	2	1 1											2
S. Glostrup	1	1											1
S. Hadar	5	5											1
S. Infantis	5	5											1
S. Isangi	4	4											1
S. Lexington	2	2											1
S. Livingstone	3	3											1
S. Montevideo	3	3											1
S. Ohio	3	3											1
S. Rissen	4	2											1
S. Schwarzengrund	2	1 1											2
S. Senftenberg	3	3											1
S. Virchow	2	2											1
S. Typhimurium	18	1 1 16											3
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	2											1

2.2.7 Zielgen CR2

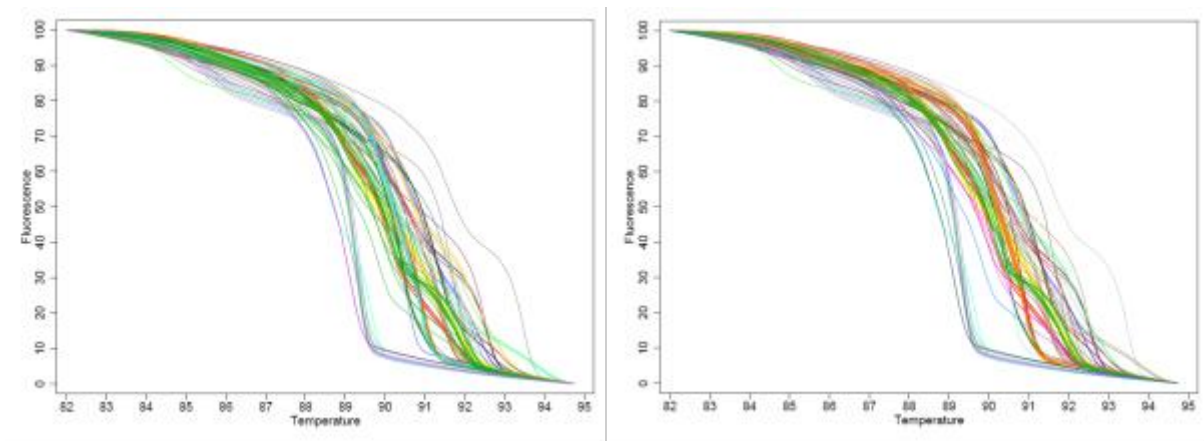


Abbildung 14: Mit Stata gezeichnete Kurven von Zielgen CR2, sortiert nach Serovar (links) und eingruppiert nach Kurvencharakteristik (rechts). Gezeigt wird jeweils nur die repräsentative Kurve eines Triplikats.

Das Zielgen CR2 lieferte die höchste Gruppenanzahl mit insgesamt 37 Gruppen exklusive negativer Proben. Auch die Varianz war breit gestaffelt. Es fanden sich zehn Serovare, die in nur eine Gruppe eingeteilt werden können (*Salmonella* Anatum, *Salmonella* Blockley, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Enteritidis (inkl. *Salmonella*-Enteritidis-Impfstämme), *Salmonella* Glostrup, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Lexington, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Schwarzengrund), sieben Serovare mit zwei Gruppen (*Salmonella* Bredeney, Derby, Give, Isangi, Livingstone, Montevideo, Virchow), drei Serovare mit drei Gruppen (*Salmonella* Infantis, Rissen, Senftenberg) sowie *Salmonella* Typhimurium (inkl. *Salmonella*-Typhimurium-Impfstämme), welches sich auf sieben Gruppen aufteilte (siehe Tabelle 44). Bei CR2 wurde der Ct-Wert bei Zyklus 30 mit einem Threshold von 0,6 festgesetzt.

Tabelle 44: Gruppenschema für Zielgen CR2. Einordnung der Serovare in verschiedene Gruppen anhand der Kurvenverläufe und Kurvenverschiebungen. Die Gruppenvarianz gibt an, auf wie viele unterschiedliche Gruppen sich die Proben eines Serovars verteilen.

[illegible]

2.2.8 CR_F CR1_R

Dieses Primerpaar wurde ursprünglich in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 für eine genauere Genotypisierung des Serovars *Salmonella* Enteritidis konzipiert. Das Primerpaar wurde dennoch auch mit den übrigen Serovaren geprüft. Die Ergebnisse wurden jedoch nicht in das endgültige Schema mit einbezogen. Hauptsächlich, da sich bei der Amplifikation ein auffallend später Anstieg der Kurven zeigte (erst zwischen Zyklus 25-30). Die Vermutung lag daher nahe, dass es sich um unspezifische Amplifikationen handelte. Die Entscheidung, die Ergebnisse dieses Zielgens nicht zu berücksichtigen, wurde zusätzlich dadurch unterstützt, dass keine weiteren hilfreichen Informationen für die Serovarunterscheidung gewonnen werden konnten. Auch das Serovar *Salmonella* Enteritidis, welches in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 mit dieser Primerkombination näher genotypisiert werden sollte, zeigte den späten Kurvenanstieg und konnte mit diesem Primerpaar nicht näher bestimmt werden. Insbesondere im Vergleich zu den *Salmonella*-Enteritidis-Impfstämmen zeigte sich kein Unterschied.

2.2.9 Vergleich der eigenen Untersuchung mit den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

Im Anschluss an den eigenen Versuch sollten die Ergebnisse mit denen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verglichen werden.

Tabelle 45 bietet einen Überblick über die gesamten Ergebnisse unter Einbezug aller geprüften Serovare und Zielgene. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011. Diese sind zum Vergleich in Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 45: Übersicht über die Gruppen aller Zielgene nach der Durchführung der HRM auf dem LightCycler® 96. Bei Serovaren, die sich innerhalb eines Zielgens auf mehrere Gruppen verteilen ist dies durch andere Grautöne gekennzeichnet.

Serovar	Anzahl	Gruppeneinteilung						
		A	I	K	yohM	shdA	CR1	CR2
S. Anatum	1	5	10	3	4	4	neg.	1
S. Blockley	4	5	3	6	2	5	1	2
S. Bredeney	9	6	7	2	4	8	2	3
S. Bredeney	1	5	9	4	2	10	3	4
S. Choleraesuis	1	5	4	1	3	2	4	5
S. Derby	2	7	2	4	1	13	neg.	6
S. Derby	1	5	5	4	4	9	neg.	7
S. Dublin	4	5	5	2	4	3	5	8
S. Dublin	2	5	5	2	3	3	5	8
S. Enteritidis	12	4	1	2	1	3	6	9
S. Enteritidis	1	4	1	2	1	3	7	9
S. Enteritidis	1	4	1	2	1	3	8	9
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	4	1	2	1	3	6	9
S. Give	1	6	6	2	4	1	6	10
S. Give	1	6	1	2	6	8	2	11
S. Glostrup	1	5	3	2	6	8	neg.	12
S. Hadar	4	4	1	6	7	2	neg.	13
S. Infantis	3	1	1	6	5	15	neg.	14
S. Infantis	1	1	1	6	5	15	neg.	15
S. Infantis	1	1	1	7	9	7	neg.	9
S. Isangi	3	5	1	6	6	13	neg.	16
S. Isangi	1	5	1	6	4	14	neg.	17
S. Lexington	2	5	1	2	3	12	neg.	18
S. Livingstone	2	5	4	2	8	15	neg.	19
S. Livingstone	1	5	4	2	8	15	neg.	36
S. Montevideo	2	3	4	5	5	8	neg.	20
S. Montevideo	1	2	3	2	5	8	neg.	21
S. Ohio	3	2	5	6	4	5	neg.	22
S. Rissen	2	5	6	2	2	11	neg.	neg.
S. Rissen	1	5	6	2	2	11	neg.	23
S. Rissen	1	7	8	5	1	11	neg.	24
S. Schwarzengrund	1	7	6	2	4	8	neg.	25
S. Schwarzengrund	1	7	6	2	6	8	2	25
S. Senftenberg	1	2	5	5	2	6	neg.	26
S. Senftenberg	1	2	5	5	2	6	neg.	27
S. Senftenberg	1	5	3	5	2	neg.	neg.	neg.
S. Virchow	1	5	5	5	2	13	neg.	28
S. Virchow	1	5	10	5	6	13	neg.	37
S. Typhimurium	9	4	5	2	6	15	neg.	29
S. Typhimurium	2	4	5	2	5	15	neg.	29
S. Typhimurium	1	4	5	2	5	15	neg.	34
S. Typhimurium	1	4	5	2	4	15	neg.	35
S. Typhimurium	1	4	5	2	4	15	neg.	33
S. Typhimurium	1	4	5	2	6	15	9	30
S. Typhimurium	1	4	5	2	6	15	10	31
S. Typhimurium	1	4	5	2	6	15	neg.	32
S. Typhimurium	1	4	5	2	6	15	neg.	30
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	4	5	2	5	15	neg.	35

Tabelle 46: Nach Bratchikov und Mauricas (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011). Gezeigt werden die Anzahl der geprüften Stämme eines Serovars sowie die Gruppeneinteilung in den jeweiligen Zielgenen. Die Nummerierung der Gruppen erfolgte willkürlich und hat keine Verbindung mit den in den eigenen Ergebnissen verwendeten, ebenfalls willkürlich gewählten, Gruppen.

Anzahl Gesamt	Serovar	Gruppeneinteilung							Anzahl		
		A	I	K	CR 1	CR 2	yohM	shdA	CR_F CR1_R	Pro Genotyp	Genotypen
38	S. Enteritidis	6	3	4	1	1	1	1	1	1	3
		6	3	4	2	1	1	1	2	28	
		6	3	4	2	1	1	1	3	9	
25	S. Typhimurium	2	7	4	3	30	2	2		1	8
		2	7	4	4	32	2	2		4	
		6	7	4	5	28	2	2		4	
		6	7	4	6	26	3	2		2	
		6	7	4	7	33	2	2		10	
		6	7	4	8	31	2	2		1	
		2	7	4	9	32	2	2		2	
6	7	4	7	29	2	2		1			
5	S. London	4	7	4	-	2	11	7		5	1
14	S. Agona	8	4	5	10	11	8	3		3	4
		8	4	5	10	11	12	3		9	
		8	4	5	10	8	12	3		1	
		9	2	5	11	13	7	4		1	
3	S. Chester	3	5	4	-	5	10	14		1	2
		6	7	4	15	18	2	2		2	
2	S. Abony	10	7	5	-	15	4	4		2	1
8	S. Infantis	1	3	6	23	23	10	2		1	6
		10	6	1	13	7	12	15		1	
		1	3	6	23	22	10	2		2	
		10	7	5	21	21	15	6		1	
		5	1	2	16	24	7	10		1	
		1	3	6	25	22	10	2		2	
7	S. Mbandaka	11	6	5	-	21	12	11		6	2
		11	6	5	25	21	12	11		1	
3	S. Derby	9	2	5	11	6	7	4		1	2
		10	7	5	17	26	15	9		2	
2	S. Dublin	10	7	4	12	3	13	1		2	1
3	S. Glostrup	6	3	7	24	27	8	15		3	1
3	S. Goldcoast	5	1	3	16	16	7	10		3	1
4	S. Hadar	6	3	7	24	27	8	15		4	1
2	S. Isangi	10	3	7	27	12	15	3		2	1
2	S. Kottbus	10	7	7	30	10	14	15		1	2
		10	7	7	30	10	15	15		1	
2	S. Livingstone	6	5	5	26	14	11	5		1	2
		10	3	7	31	12	15	3		1	
2	S. Manhattan	10	5	7	29	4	12	15		2	1
2	S. Montevideo	10	7	4	14	20	9	8		1	2
		7	7	5	18	16	5	13		1	
4	S. Newport	10	7	5	19	19	15	11		3	2
		10	7	5	-	25	15	12		1	
3	S. Virchow	10	8	5	22	17	15	6		1	3
		10	8	5	20	9	6	6		1	
		10	7	5	28	21	15	6		1	

Zieht man nun den Vergleich der in Tabelle 45 und Tabelle 46 dargestellten Ergebnisse unter der Berücksichtigung von Tabelle 47, welche nochmals genauer auf die Unterschiede in der Gruppenvarianz eingeht, so lassen sich für die einzelnen Zielgene folgende Schlussfolgerungen formulieren:

Zielgen A :

Hier lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse der Publikation die Serovare in insgesamt mehr Gruppen einteilten (sieben zu zehn Gruppen).

Die Betrachtung der Gruppenvarianz zeigt, dass in der Publikation *Salmonella* Derby, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Montevideo sowie *Salmonella* Typhimurium in zwei, im Falle von *Salmonella* Infantis sogar in drei Serovare eingeteilt werden konnten. Die Serovare *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Livingstone und *Salmonella* Typhimurium fanden sich bei den eigenen Ergebnissen hingegen jeweils in einer Gruppe wieder (siehe Tabelle 47).

Zielgen I:

Konnten für das Zielgen A die Serovare in weniger Gruppen unterscheiden werden, so verhielt es sich bei Zielgen I umgekehrt. Hier konnten die eigenen Ergebnisse eine Unterteilung in zehn Gruppen nachweisen, welche den sieben von Bratchikov und Mauricas gefundenen, gegenüber stehen.

Bei der Gruppenvarianz stehen die eigenen Ergebnisse für *Salmonella* Infantis/*Salmonella* Livingstone/*Salmonella* Montevideo mit 1/1/2 Gruppen den Ergebnissen mit 4/2/1 Gruppen gegenüber (siehe Tabelle 47).

Zielgen K:

Hier zeigten sich in beiden Fällen exakt gleich viele Gruppeneinteilungen (sieben Gruppen). Im Vergleich der Gruppenvarianz zeigten die eigenen Ergebnisse bei *Salmonella* Infantis zwei Gruppen, die der Publikation hingegen vier. Ähnlich verhielt es sich bei Serovar Livingstone. Dieses beschränkte sich in den eigenen Ergebnissen auf eine Gruppe, in der Publikation sind es zwei (siehe Tabelle 47).

Zielgen yohM:

yohM hingegen zeigt einen deutlichen Unterschied zu den eigenen Ergebnissen. Bratchikov und Mauricas teilten ihre Ergebnisse in insgesamt 15 Gruppen, dies steht den neun Gruppen in den eigenen Ergebnissen gegenüber.

Auch im Vergleich der Gruppenvarianz zeigte yohM einen deutlichen Unterschied. Die Gruppenanzahlen unterscheiden sich bei insgesamt sechs der elf verglichenen Serovare (*Salmonella* Dublin, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Isangi, *Salmonella* Livingstone,

Salmonella Montevideo, *Salmonella* Typhimurium) (siehe Tabelle 47).

Zielgen *shdA*:

Hier gleichen sich die eigenen Ergebnisse mit denen der Publikation. Beide Male konnten die Serovare in 15 Gruppen unterschieden werden.

Bei der Gruppenvarianz finden sich Unterschiede bei insgesamt vier Serovaren (*Salmonella* Infantis, *Salmonella* Isangi, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Montevideo) (siehe Tabelle 47).

Zielgen CR1:

CR1 ist das einzige Zielgen, welches bei Bratchikov und Mauricas nicht auswertbare Ergebnisse lieferte. Dies geschah dort allerdings nur im Fall von fünf Serovaren (*Salmonella* London, *Salmonella* Chester, *Salmonella* Abony, *Salmonella* Mbandaka sowie *Salmonella* Newport). Bei den eigenen Ergebnissen war dies bei insgesamt 14 Serovaren der Fall. Weiterhin ist fest zu stellen, dass die Autoren der Publikation mit 31 Gruppen (gegen lediglich zehn Gruppen) die Serovare in bedeutend mehr Gruppen unterteilen konnten.

Hier zeigt auch der Vergleich der Gruppenvarianz den größten Unterschied. Bei diesem unterscheiden sich sieben der verglichenen elf Serovare. Bei sechs Serovaren ist die Gruppenvarianz bei den Ergebnissen der Publikation höher. Lediglich *Salmonella* Enteritidis zeigt eine niedrigere Varianz (siehe Tabelle 47).

Zielgen CR2:

Im Fall von CR2 hingegen sind beide Ergebnisse ähnlich, da sowohl die der Publikation als auch die eigenen Ergebnisse ein hohes Maß unterschiedlicher Gruppen (33 zu den 37 der eigenen Ergebnisse) lieferten.

Der Vergleich der Gruppenvarianz fällt hier ebenfalls kongruenter aus als bei CR1. Es finden sich Unterschiede bei vier Serovaren (*Salmonella* Infantis, *Salmonella* Isangi, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Virchow) (siehe Tabelle 47).

Tabelle 47: Vergleich aller Serovare die sowohl im eigenen Versuchsaufbau als auch in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendet wurden. Gezeigt wird die jeweilige Gruppenvarianz. Ergebnisse, bei denen diese unterschiedlich ausfällt, sind grau hinterlegt.

Zielgen		Serovar										
		S. Derby	S. Dublin	S. Enteritidis	S. Glostrup	S. Hadar	S. Infantis	S. Isangi	S. Livingstone	S. Montevideo	S. Typhimurium	S. Virchow
A	LC 96	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
	Publikation	2	1	1	1	1	3	1	2	2	2	1
I	LC 96	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2
	Publikation	2	1	1	1	1	4	1	2	1	1	2
K	LC 96	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1
	Publikation	1	1	1	1	1	4	1	2	2	1	1
yohM	LC 96	2	2	1	1	1	2	2	1	1	3	2
	Publikation	2	1	1	1	1	4	1	2	2	2	2
shdA	LC 96	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1
	Publikation	2	1	1	1	1	4	1	2	2	1	1
CR1	LC 96	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	1
	Publikation	2	1	2	1	1	5	1	2	2	7	3
CR2	LC 96	2	1	1	1	1	3	2	2	2	7	2
	Publikation	2	1	1	1	1	5	1	2	2	8	3

Besonders hervorzuheben war letztlich noch die Möglichkeit der Unterscheidung von *Salmonella* Hadar und *Salmonella* Glostrup in den eigenen Ergebnissen. Dies war nach den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 nicht möglich. Daher wurden für einen eigenen Versuch DNS-Proben durch einen der Autoren der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 zur Verfügung gestellt und untersucht. Um noch weitere Vergleichsproben überprüfen zu können, geschah dies unter Verwendung fünf weiterer *Salmonella*-Glostrup- und vier *Salmonella*-Hadar-Serovare. Diese wurden durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Verfügung gestellt. Geprüft wurden daher die drei *Salmonella*-Glostrup-Serovare aus der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 sowie sechs *Salmonella*-Glostrup- beziehungsweise vier *Salmonella*-Hadar-Vergleichsproben. Dies geschah mit allen oben genannten Zielgenen (exklusive CR_F CR1_R).

Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch für diese Untersuchungen das Ergebnis auf Zielgen K. Die Stämme aus der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verhielten sich ebenso wie die Proben von *Salmonella* Hadar, wohingegen die sechs Vergleichsstämme von *Salmonella* Glostrup eindeutig von den übrigen Proben abzugrenzen waren. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls bei den anderen Zielgenen beobachtet werden.

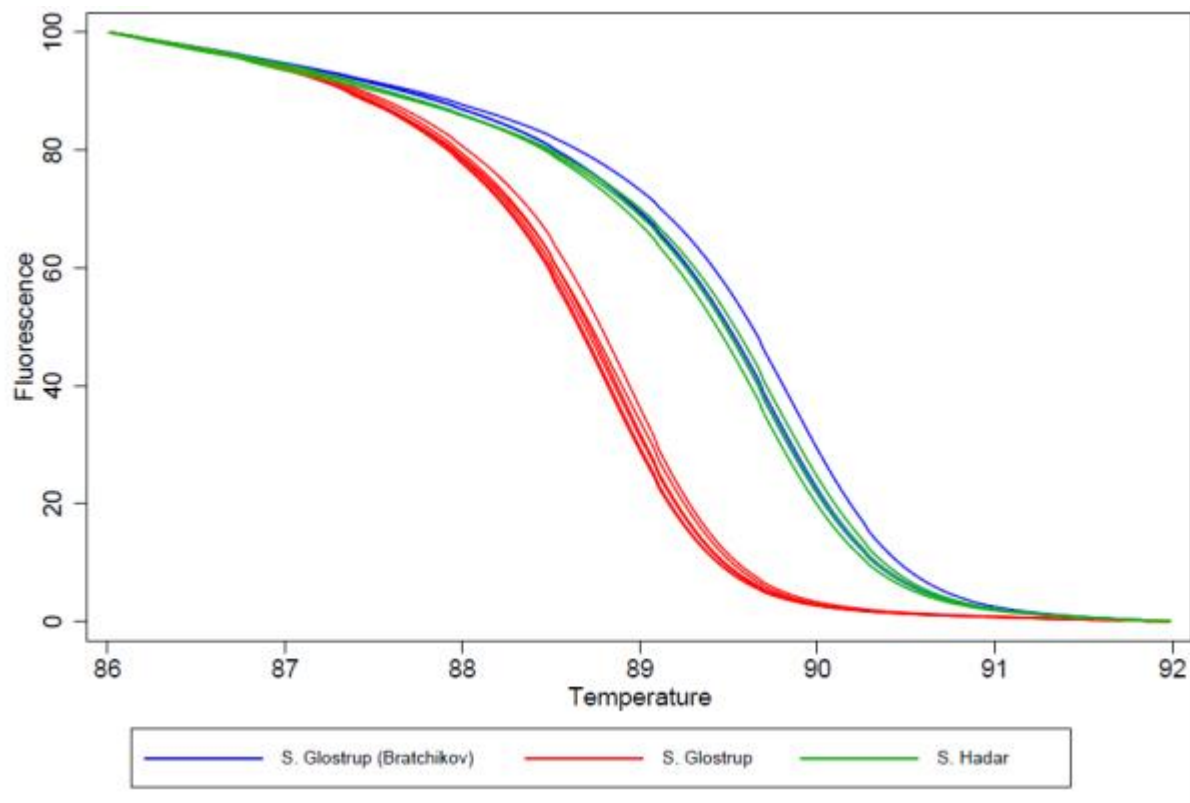


Abbildung 15: Beispiel anhand des Zielgens K für den Vergleich der drei in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten Proben mit sechs Vergleichsstämmen des Serovars *Salmonella* Glostrup und vier Stämmen des Serovars *Salmonella* Hadar. Da sich einige Kurven überlagern, erscheinen diese nicht sichtbar. Diese Überlagerung findet jedoch nur mit Proben des gleichen Serovars statt. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA) angefertigt.

2.2.10 Genauere Betrachtung der Ergebnisse für die Zielgene A, I und K

Die genauere Betrachtung der Zielgene A, I und K war von besonderem Interesse, da die drei Zielgene aufgrund des gleichen Thermoprofiles zeitsparend, mit nur einem Lauf ausgeprüft werden konnten. Somit bietet sich hier das Potential alle verwendeten Proben innerhalb eines einzelnen Laufs differenzieren zu können. Hierzu kann neben der bereits beschriebenen Darstellung und Vergleichs der Schmelzkurven als normalisierte Kurven, auch die Darstellung im so genannten „Difference Plot“ herangezogen werden. Für diesen wurde je ein Referenzstamm bei allen Läufen mitgeprüft und von den Kurven aller anderen Proben abgezogen. Der Referenzstamm stellt somit die Nulllinie dar, die übrigen Kurven zeigen den jeweiligen Differenzwert an.

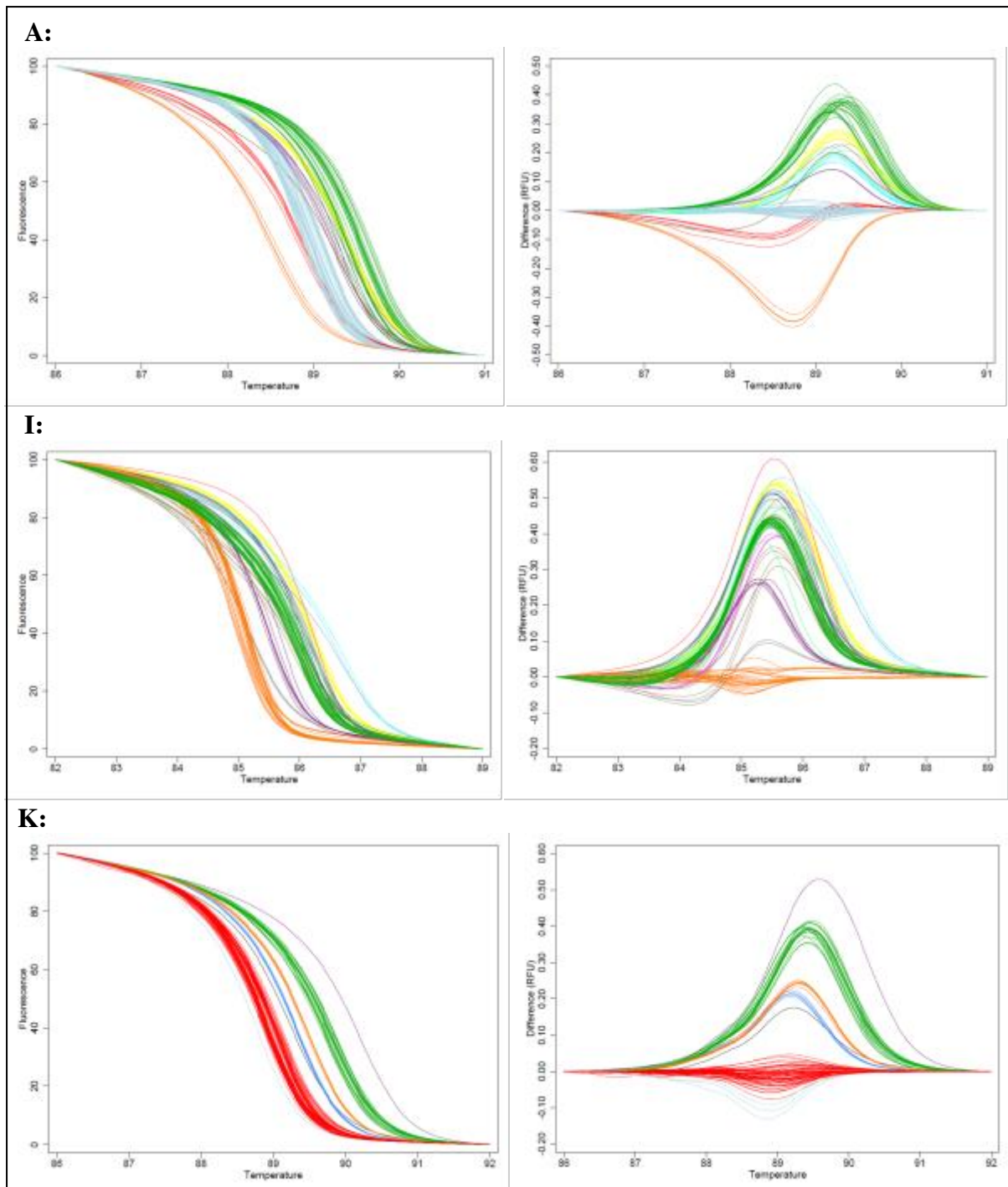


Abbildung 16: Darstellung der 100 Schmelzkurven als normalisierte Kurven (links) und im Difference Plot (rechts) für die Zielgene A, I und K. Als Referenzstamm für den Difference Plot diente in allen drei Fällen ein *Salmonella* Enteritidis Stamm.

Beide Darstellungsvarianten zeigen, dass die gesamte Probenauswahl bereits nur mit den vergleichsweise variationsarmen Zielgenen A, I und K differenzierbar war. Vergleicht man beide Darstellungsformen, so gruppierte sich der Großteil der Proben in beiden Fällen gleich ein. Einige wenige Proben zeigten im Difference Plot hingegen einen abgewandelten Charakter und boten somit noch mehr Variation, um die Proben erfolgreich differenzieren zu

können. Einen Überblick liefert Tabelle 48.

Tabelle 48: Überblick über eine mögliche Differenzierung nur mit den Genen A, I und K. Gezeigt wird die Eingruppierung anhand der normalisierten Kurven sowie dem Difference Plot. Proben, die im Difference Plot anders gruppiert werden, sind rot unterlegt.

Gruppenübersicht A,I,K								
		Normalisierte Kurven			Difference Plot			
Serovar	Anzahl	A	I	K		A	I	K
S. Anatum	1	5	10	3		5	10	3
S. Blockley	4	5	3	6		5	3	6
S. Bredeney	9	6	7	2		6	7	2
S. Bredeney	1	5	9	4		5	9	4
S. Choleraesuis	1	5	4	1		5	4	1
S. Derby	2	7	2	4		7	2	4
S. Derby	1	5	5	4		5	5	4
S. Dublin	6	5	5	2		5	5	2
S. Enteritidis	14	4	1	2		4	1	2
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	4	1	2		4	1	2
S. Give	1	6	6	2		8	11	2
S. Give	1	6	1	2		8	1	2
S. Glostrup	1	5	3	2		9	3	2
S. Hadar	4	4	1	6		4	1	6
S. Infantis	4	1	1	6		1	1	6
S. Infantis	1	1	1	7		1	1	7
S. Isangi	4	5	1	6		5	1	6
S. Lexington	2	5	1	2		10	1	1
S. Livingstone	3	5	4	2		7	4	2
S. Montevideo	2	3	4	5		3	14	5
S. Montevideo	1	2	3	2		2	3	2
S. Ohio	3	2	5	6		2	5	6
S. Rissen	3	5	6	2		5	6	2
S. Rissen	1	7	8	5		6	8	5
S. Schwarzengrund	2	7	6	2		7	6	2
S. Senftenberg	2	2	5	5		2	12	5
S. Senftenberg	1	5	3	5		5	13	5
S. Virchow	1	5	5	5		5	14	5
S. Virchow	1	5	10	5		5	10	5
S. Typhimurium	18	4	5	2		4	5	2
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	4	5	2		4	5	2

Verglich man dies mit den Ergebnissen in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 so zeigte sich, dass dort eine Differenzierung der gewählten Stämme nur unter Verwendung der Zielgene A,I und K nicht möglich war. Tabelle 49 zeigt die Stämme, die dort nicht (im Gegensatz zu den Ergebnissen auf dem LightCycler® 96) mit diesen drei Zielgenen unterschieden werden konnten.

Tabelle 49: Stämme, die nach den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 nicht anhand der Zielgene A, I und K unterscheidbar waren.

Serovar	Eingruppierungsschema
S. Typhimurium	A,I,K 674
S. Chester	A,I,K 674
S. Abony	A,I,K 1075
S. Infantis	A,I,K 1075
S. Derby	A,I,K 1075
S. Newport	A,I,K 1075
S. Dublin	A,I,K 1074
S. Montevideo	A,I,K 1074
S. Glostrup	A,I,K 637
S. Hadar	A,I,K 637
S. Isangi	A,I,K 1037
S. Livingstone	A,I,K 1037

2.2.11 Ergebnis der Prüfung des Primerpaares FljB-1,2/1,5 für die zusätzliche Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-)

Zur Erweiterung des Differenzierungspotentials der Methode im Bezug auf das Serovar *Salmonella* Typhimurium sollte eine Unterscheidungsmöglichkeit der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) mit Hilfe des Primerpaares FljB-1,2/1,5 aus der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 untersucht werden.

Die Abbildung 17 zeigt das Amplifikations-Ergebnis für das Primerpaar FljB-1,2/1,5 in der HRM Analyse. Da bei der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) der Genort *fljB* nicht vorhanden ist, wurde dort, wie erwartet, kein Produkt in der PCR gebildet. Es kam daher bei diesen Proben zu keinem Anstieg der Fluoreszenz vor dem 30. Zyklus und die Proben wurden als negativ gewertet. Dies war bei allen der elf geprüften Proben der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) der Fall. Die

Salmonella-Typhimurium-Isolate mit der Antigenformel $\underline{1},4,[5],12:i:1,2$ hingegen zeigten alle eine gute Amplifikation. Somit konnte hier eine weitere Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Proben in die Antigenformeln $\underline{1},4,[5],12:i:1,2$ und $\underline{1},4,[5],12:i:-$ durchgeführt werden.

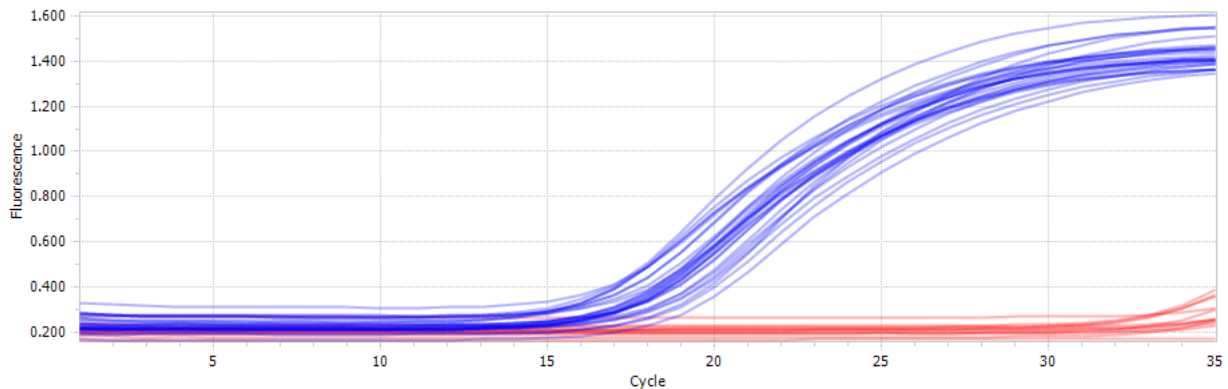


Abbildung 17: Zeigt die Amplifikationskurven des Primerpaares FljB-1,2/1,5 in der HRM Analyse. Geprüft wurden elf *Salmonella*-Typhimurium-Stämme ($\underline{1},4,[5],12:i:-$) (rot) sowie 28 *Salmonella*-Typhimurium-Proben ($\underline{1},4,[5],12:i:1,2$) (blau). Da die Variante $\underline{1},4,[5],12:i:-$ keinen Zielort für dieses Primerpaar bietet, weisen diese Stämme auch keine Amplifikation auf. Die Abbildung wurde aus der LightCycler® 96 Software 1.1 entnommen.

2.2.12 Ergebnis der Prüfung einer Differenzierungsmethode der *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ ($\underline{1},4,12:i:1,2$)

Ebenso wie im vorangegangenen Kapitel sollte, für eine Verbesserung des diskriminatorischen Potentials der Methode bei *Salmonella* Typhimurium, eine Unterscheidungsmöglichkeit der *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ ($\underline{1},4,12:i:1,2$) untersucht werden. Hierzu wurde das mit dem O5-Antigen in Verbindung stehende *oafA*-Gen mit fünf Primerkombinationen in einer HRM-Analyse untersucht. Diese Primerkombinationen richteten sich auf verschiedene, bei den getesteten Proben publizierte Mutationen innerhalb dieses Gens. Somit sollten die O5-negativen Proben im Vergleich zu den Stämmen mit dem O5-Antigen hier bei mindestens einem Primerpaar eine unterschiedliche Reaktion zeigen.

Tabelle 50 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der fünf Primerkombinationen. Die Proben 1 und 2 sowie 4-6 zeigten bei unterschiedlichen Kombinationen negative Ergebnisse. Bei den Proben 1 und 7-10 hingegen zeigten manche Proben in einigen Fällen eine andere Schmelzkurvenform. Die Referenzstämme (11-15) sowie die Probe 3 zeigten keinerlei

Veränderungen. Bis auf Probe 3 und Probe 6 zeigten alle Proben die zu erwartenden Reaktionen.

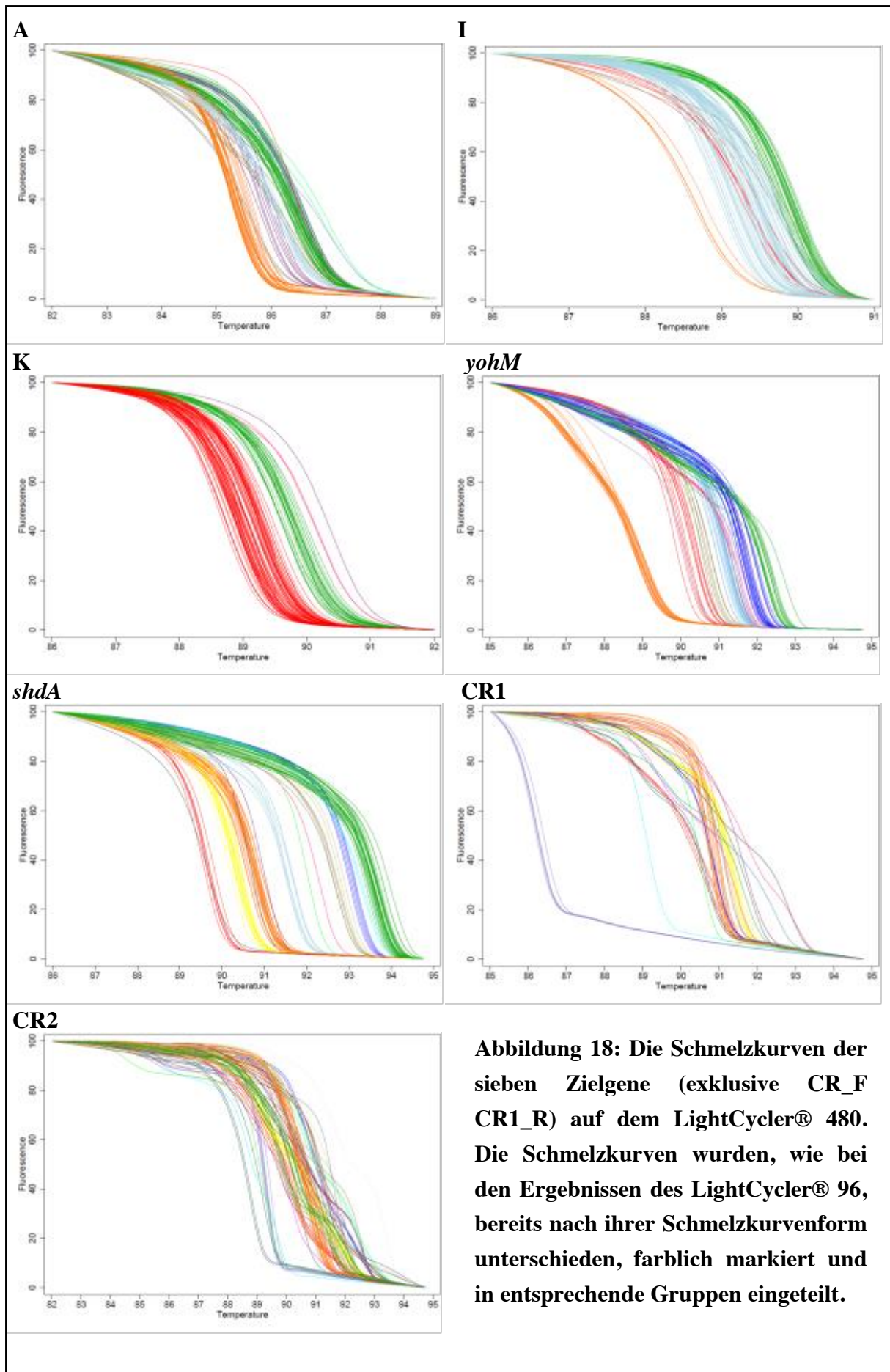
Tabelle 50: Zeigt das Ergebnis der fünf Primerkombinationen für die Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2) bzw. (1,4,12:i:-). Die letzte Spalte nennt die Primerkombinationen, welche die bekannte Mutationsstelle für die jeweilige Probe abdecken und somit eine andere Reaktion zeigen müssten. Dies ist bei den Ziffern in schwarz der Fall, bei in rot geschriebenen Kombinationsnummern hingegen nicht.

Nr.	Typ	Primer Kombination:					Erwartung
		1	2	3	4	5	
1	S.T. (<u>1</u> ,4,12:i:-)	neg.	neg.	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 2	1,2,5
2	S.T. (<u>1</u> ,4,12:i:-)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	neg.	5
3	S.T. (<u>1</u> ,4,12:i:-)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	4
4	S.T. (<u>1</u> ,4,12:i:-)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	neg.	Gruppe 1	(4)
5	S.T. (<u>1</u> ,4,12:i:-)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	neg.	Gruppe 1	(4)
6	S. T. (<u>1</u> ,4,12:i:1,2)	Gruppe 1	neg.	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	1,2,5
7	S. T. (<u>1</u> ,4,12:i:1,2)	Gruppe 2	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 3	1,2,5
8	S. T. (<u>1</u> ,4,12:i:1,2)	Gruppe 2	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 3	1,2,5
9	S. T. (<u>1</u> ,4,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 1	3
10	S. T. (<u>1</u> ,4,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	4
11	S. T. (<u>1</u> ,4,5,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	-
12	S. T. (<u>1</u> ,4,5,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	-
13	S. T. (<u>1</u> ,4,5,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	-
14	S. T. (<u>1</u> ,4,5,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	-
15	S. T. (<u>1</u> ,4,5,12:i:1,2)	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	Gruppe 1	-

2.3 Durchführung der HRM-Analyse mit dem LightCycler® 480

Zu Vergleichszwecken wurden alle acht Zielgene aus der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 ebenfalls auf dem LightCycler® 480 mit den gleichen, unter III.2.2 genannten, 100 Isolaten untersucht. Der Versuchsaufbau war identisch mit dem auf dem LightCycler® 96.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse aller Zielgene mit Ausnahme des Primerpaares CR_F CR1_R. Dieses wurde auch hier, wie bei den Daten des LightCycler® 96, nicht weiter berücksichtigt (siehe IV.2.2.8). Die in Abbildung 18 dargestellten Schmelzkurven wurden bereits in Gruppen eingeteilt und entsprechend farblich markiert.



Betrachtet man Abbildung 18 genauer, so fällt eine sehr große Varianz der Kurven auf. Dies bedeutet, dass sich einige Kurvengruppen, die bei den Ergebnissen des LightCycler® 96 noch voneinander trennbar waren, hier gegenseitig überlagern und somit nur als eine gemeinsame Gruppe geführt werden können. Dies senkt entsprechend die Differenzierungsmöglichkeiten für die einzelnen Serovare. Daher konnten diese insgesamt in fünf Gruppen (Zielgen A), zehn Gruppen (Zielgen I), vier Gruppen (Zielgen K), acht Gruppen (Zielgen yohM), 14 Gruppen (Zielgen shdA), 18 Gruppen (Zielgen CR1) und 35 Gruppen (Zielgen CR2) unterteilt werden. Es zeigt sich wieder, dass die Zielgene A, I und K die variantenärmsten sind und die wenigsten Gruppen aufweisen. CR1 brachte auch hier auffällig viele negative Ergebnisse hervor und CR2 kann mit 35 Gruppen die meisten unterschiedlichen Schmelzkurvenspektren aufweisen. Tabelle 51 zeigt einen Überblick, wie diese Gruppeneinteilungen auf die einzelnen Serovare verteilt sind.

Tabelle 51: Überblick über die unterschiedlichen Gruppeneinteilungen der Serovare für die Läufe auf dem LightCycler® 480. Bei Serovaren, die sich innerhalb eines Zielgens auf mehrere Gruppen verteilen ist dies durch andere Grautöne gekennzeichnet.

Serovar	Anzahl	A	I	K	yohM	shdA	CR1	CR2
S. Anatum	1	5	9	2	2	7	neg.	1
S. Blockley	3	5	3	2	1	7	1	neg.
S. Blockley	1	5	3	2	1	7	1	2
S. Bredeney	9	4	10	1	2	4	2	3
S. Bredeney	1	5	7	2	1	9	3	4
S. Choleraesuis	1	5	4	1	3	2	4	5
S. Derby	2	4	2	2	4	12	neg.	6
S. Derby	1	5	5	2	2	8	neg.	7
S. Dublin	4	5	5	1	2	3	5	8
S. Dublin	2	5	5	1	3	3	5	8
S. Enteritidis	13	4	1	1	4	3	6	9
S. Enteritidis	1	4	1	1	4	3	7	9
S. Enteritidis (Impfstamm)	2	4	1	1	4	3	6	9
S. Give	1	4	10	1	2	1	neg.	10
S. Give	1	4	1	1	5	4	12	11
S. Glostrup	1	4	3	1	5	4	neg.	12
S. Hadar	4	4	1	2	6	2	neg.	13
S. Infantis	3	1	1	2	7	10	neg.	14
S. Infantis	1	1	1	2	7	10	neg.	15
S. Infantis	1	1	1	4	5	6	neg.	9

Fortsetzung der Tabelle 51.

Serovar	Anzahl	A	I	K	yohM	shdA	CR1	CR2
S. Isangi	3	5	1	2	5	12	neg.	16
S. Isangi	1	5	1	2	2	10	11	17
S. Lexington	2	4	1	1	3	11	neg.	neg.
S. Livingstone	2	4	4	1	2	10	neg.	18
S. Livingstone	1	4	4	1	2	10	neg.	19
S. Montevideo	1	2	3	1	7	4	neg.	20
S. Montevideo	1	3	4	1	7	4	neg.	9
S. Montevideo	1	3	4	2	7	5	neg.	9
S. Ohio	2	2	5	2	2	7	neg.	21
S. Ohio	1	2	5	2	2	7	9	21
S. Rissen	2	5	10	1	1	13	neg.	neg.
S. Rissen	1	5	10	1	1	13	neg.	22
S. Rissen	1	4	8	1	4	13	10	23
S. Schwarzengrund	1	4	10	1	3	4	2	24
S. Schwarzengrund	1	4	10	1	5	4	2	24
S. Senftenberg	1	2	5	1	1	3	neg.	25
S. Senftenberg	1	2	5	1	1	3	neg.	26
S. Senftenberg	1	5	3	1	8	neg.	neg.	neg.
S. Virchow	1	5	5	1	8	14	neg.	27
S. Virchow	1	5	9	1	1	14	neg.	28
S. Typhimurium	5	4	6	1	5	10	neg.	31
S. Typhimurium	1	4	5	1	2	10	neg.	31
S. Typhimurium	1	4	5	1	7	10	neg.	31
S. Typhimurium	1	4	6	1	7	10	13	31
S. Typhimurium	1	4	5	1	7	10	17	32
S. Typhimurium	1	4	5	1	7	10	18	neg.
S. Typhimurium	1	4	6	1	7	10	14	34
S. Typhimurium	1	4	6	1	5	10	13	33
S. Typhimurium	1	4	5	1	5	10	15	35
S. Typhimurium	1	4	5	1	5	10	16	31
S. Typhimurium	1	4	6	1	5	10	neg.	29
S. Typhimurium	1	4	6	1	5	10	neg.	30
S. Typhimurium	1	4	6	1	5	10	neg.	32
S. Typhimurium	1	4	5	1	5	10	neg.	34
S. Typhimurium (Impfstamm)	2	4	6	1	7	10	8	35

Da auch hier keines der Zielgene für sich alleine genügend Informationen für eine eindeutige Differenzierung der Serovare lieferte, bot sich erneut die gesonderte Betrachtung der Zielgene A, I und K an. Diese Betrachtung zeigt Tabelle 52. Hierbei offenbart sich allerdings, dass bei den Ergebnissen des LightCycler® 480 eine Unterscheidung nur mit den Zielgenen A, I und K nicht möglich ist. Es finden sich insgesamt drei identische Profile. Diese sind *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Give, *Salmonella* Schwarzengrund (4/10/1); *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Give und *Salmonella* Lexington (4/1/1) sowie *Salmonella* Dublin und *Salmonella* Virchow (5/5/1). Daher zeigt Tabelle 52 für diese Serovare ebenfalls die Ergebnisse der übrigen Zielgene. Dort sieht man, dass eine endgültige Differenzierung aller Serovare entweder unter Zuhilfenahme des Zielgens CR2 oder der Kombination aus *yohM* und *shdA* möglich ist.

Tabelle 52: Zeigt zunächst nur die Zielgene A,I,K. Hierbei sind einige Serovare nicht voneinander differenzierbar. Dies sind *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Give, *Salmonella* Schwarzengrund (rot), *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Give und *Salmonella* Lexington (gelb) sowie *Salmonella* Dublin und *Salmonella* Virchow (grün). Die Kombination aus den Zielgenen A, I und K mit CR2 (oder einer Kombination aus *yohM* und *shdA*) ermöglicht jedoch auch hier eine endgültige Differenzierung.

Serovar	Anzahl	A	I	K		<i>yohM</i>	<i>shdA</i>	CR1	CR2
<i>S. Anatum</i>	1	5	9	2					
<i>S. Blockley</i>	4	5	3	2					
<i>S. Bredeney</i>	9	4	10	1		2	4	2	3
<i>S. Bredeney</i>	1	5	7	2					
<i>S. Choleraesuis</i>	1	5	4	1					
<i>S. Derby</i>	2	4	2	2					
<i>S. Derby</i>	1	5	5	2					
<i>S. Dublin</i>	6	5	5	1		2/3	3	5	8
<i>S. Enteritidis</i>	14	4	1	1		4	3	6/7	9
<i>S. Enteritidis</i> (Impfstamm)	2	4	1	1					
<i>S. Give</i>	1	4	10	1		2	1	neg.	10
<i>S. Give</i>	1	4	1	1		5	4	12	11
<i>S. Glostrup</i>	1	4	3	1					
<i>S. Hadar</i>	4	4	1	2					
<i>S. Infantis</i>	4	1	1	2					
<i>S. Infantis</i>	1	1	1	4					
<i>S. Isangi</i>	4	5	1	2					
<i>S. Lexington</i>	2	4	1	1		3	11	neg.	neg.
<i>S. Livingstone</i>	3	4	4	1					
<i>S. Montevideo</i>	1	2	3	1					
<i>S. Montevideo</i>	1	3	4	1					
<i>S. Montevideo</i>	1	3	4	2					
<i>S. Ohio</i>	3	2	5	2					
<i>S. Rissen</i>	3	5	10	1					
<i>S. Rissen</i>	1	4	8	1					
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	4	10	1		3/5	4	2	24
<i>S. Senftenberg</i>	2	2	5	1					
<i>S. Senftenberg</i>	1	5	3	1					
<i>S. Virchow</i>	1	5	5	1		8	14	neg.	27
<i>S. Virchow</i>	1	5	9	1					
<i>S. Typhimurium</i>	11	4	6	1					
<i>S. Typhimurium</i>	7	4	5	1					
<i>S. Typhimurium</i> (Impfstamm)	2	4	6	1					

3 Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung

Für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung der vier (je zwei *Salmonella*-Typhimurium- bzw. *Salmonella*-Enteritidis-Impfstämme), in Deutschland zugelassenen, *Salmonella*-Lebendimpfstoffe sollten die möglichen Genorte (*rpoB*, *purA/purB* sowie der *his*-Genkomplex) der phänotypischen Differenzierungsmarker geprüft werden. Hierzu wurden diese Gene durch Sequenzierung auf mögliche Mutationen hin geprüft. Diese Mutationen wiederum sollten als Grundlage für eine HRM-Analyse zur Detektion und Abgrenzung der Impfstämme von ihren jeweiligen Feldstämmen genutzt werden.

3.1 LAH-Impfstämme

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung für die LAH-Impfstämme dargestellt.

3.1.1 *rpoB*-Sequenzierung

In sieben PCR-Läufen wurden alle 4029 Nucleotide des *rpoB*-Gens sequenziert. Beim Sequenzvergleich mittels FASTA fanden sich die nachstehend beschriebenen Mutationen. Es wurden zwei Punktmutationen gefunden. Diese befanden sich zum einen an Position 1592 (*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm) zum anderen an Position 1576 (*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm). Abbildung 19 zeigt die beiden Mutationen. Beide liegen nah zueinander (Abstand 15 bp).

LAH- <i>S. -Enteritidis</i> -Impfstamm	TTACGCACAAACGTCGTATCT T CGCACTCGGCCC
Feldstamm	TTACGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCC
LAH- <i>S. -Typhimurium</i> -Impfstamm	TTACG G ACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCC

Abbildung 19: Übersicht der gefundenen SNPs im *rpoB*-Gen. Dargestellt sind die beiden LAH-Impfstämme im Vergleich zu Feldstamm *Salmonella*-Typhimurium-14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1).

Wie Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen bewirken beide SNPs den Austausch einer Aminosäure im Aufbau des kodierten Proteins. Im Falle des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes handelte es sich hierbei um einen Austausch von Histidin zu Asparaginsäure. Betrachtet man den pH-Wert und die Polarität beider Aminosäuren, so lässt sich feststellen, dass Histidin basisch und polar ist wohingegen Asparaginsäure ebenfalls polar ist, aber einen sauren Charakter aufweist. Bei *Salmonella* Enteritidis wurde Serin gegen Phenylalanin getauscht. Diese weisen beide einen neutralen pH-Wert auf, allerdings ist Serin ungeladen

polar wohingegen Phenylalanin unpolar ist.

	490	500	510	520	530	540	550	560
Feld	LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITH	KRRISALGPGGLTRERAGFEVRDVHPTHYGRVCP						
Impf	LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITH	KRRISALGPGGLTRERAGFEVRDVHPTHYGRVCP						
	490	500	510	520	530	540	550	560

Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenz, die durch das *rpoB*-Gen des LAH-*Salmonella*-Typhimurium-(Impf)stammes kodiert wird, im Vergleich zu (Feld)stamm *Salmonella*-Typhimurium-14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1). Die Mutation bewirkt einen Austausch von Histidin (H) gegen Asparaginsäure (D) an der Stelle 526.

	490	500	510	520	530	540	550	560
Feld	LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITH	KRRISALGPGGLTRERAGFEVRDVHPTHYGRVCP						
Impf	LGDLDTLMPQDMINAKPISAAVKEFFGSSQLSQFMDQNNPLSEITH	KRRISALGPGGLTRERAGFEVRDVHPTHYGRVCP						
	490	500	510	520	530	540	550	560

Abbildung 21: Vergleich der Aminosäuresequenz, die durch das *rpoB*-Gen des LAH-*Salmonella*-Enteritidis-(Impf)stammes kodiert wird, im Vergleich zu (Feld)stamm *Salmonella*-Typhimurium-14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1). Die Mutation bewirkt einen Austausch von Serin (S) gegen Phenylalanin (F) an der Stelle 531.

3.1.2 Auswahl des geeignetsten Primerpaares

Für die Detektion der Mutationen wurden fünf unterschiedliche Primerpaare getestet.

Es konnten bei allen der fünf geprüften Primerpaare sowohl der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm, als auch der *Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm von den Feldstämmen differenziert werden. Der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm zeigte bei allen fünf Paaren, im Vergleich zu den Feldstämmen, sehr deutlich zu unterscheidende Schmelzkurven, wohingegen die Schmelzkurven des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes für die verschiedenen Primerpaare gesondert betrachtet werden müssen.

So waren insbesondere die Kurven der Primerkombinationen 2, 3 und 5 nur undeutlich von denen der Feldstämmen abgegrenzt. In den Ansätzen 1 und 4 hingegen konnten die Kurven des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes eindeutig differenziert werden. Da bei der Primerkombination 1 die Kurvenverschiebung minimal deutlicher ausfiel, wurde letztlich dieses Paar für die HRM-Analyse ausgewählt. Alle Schmelzkurven für die verschiedenen Primerkombinationen sind in Abbildung 22 dargestellt.

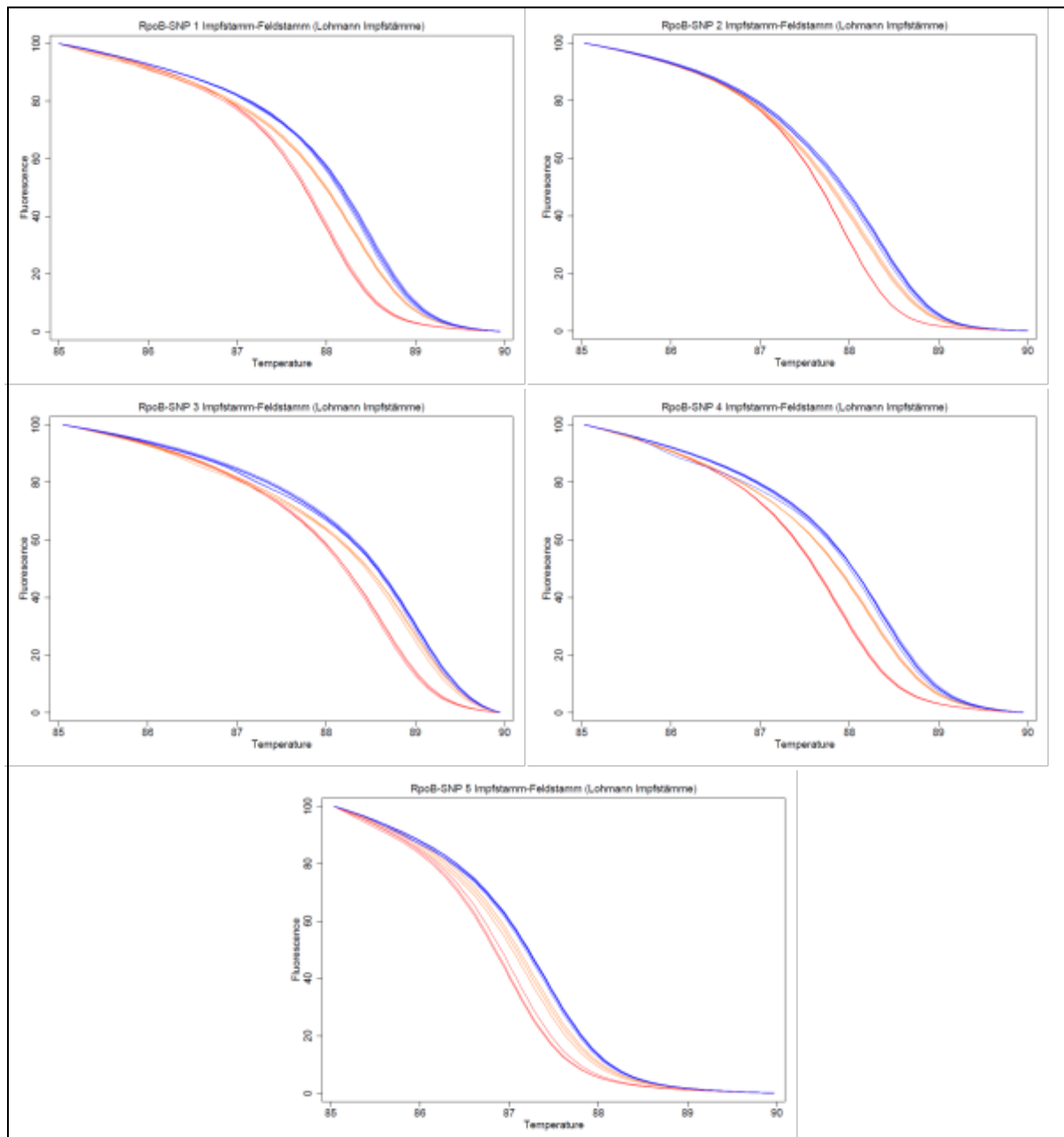


Abbildung 22: Schmelzkurven der fünf unterschiedlichen Primerkombinationen (siehe auch Kapitel III.7.3.2). Es wurden jeweils im Dreifachansatz die beiden LAH-Impfstämme (*Salmonella* Enteritidis: rot, *Salmonella* Typhimurium: orange) sowie zwei Feldstämme (blau) geprüft. Die Darstellung erfolgte über Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA).

3.1.3 Validierung mit allen Proben

Nach Auswahl des Primerpaares 1 wurde dieses mit allen unter III.2.3 genannten Proben geprüft.

Beide LAH-Impfstämme waren eindeutig von den Feldstämmen (28 *Salmonella* Enteritidis und 25 *Salmonella* Typhimurium) sowie den beiden IDT-Impfstämmen zu differenzieren. Letztgenannte wiesen, da sie keine Mutation auf dem *rpoB*-Gen besitzen, die gleichen Schmelzkurven wie die Feldstämmen auf.

Da es sich bei der Mutation des LAH-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes um einen SNP der Klasse 1, bei der Mutation des LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes hingegen um einen SNP der Kategorie 3 handelte, ist die Schmelzkurvenverschiebung für den *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm wesentlich ausgeprägter, als die des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes. Der Schmelzbereich lag zwischen 86 °C und 89 °C. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

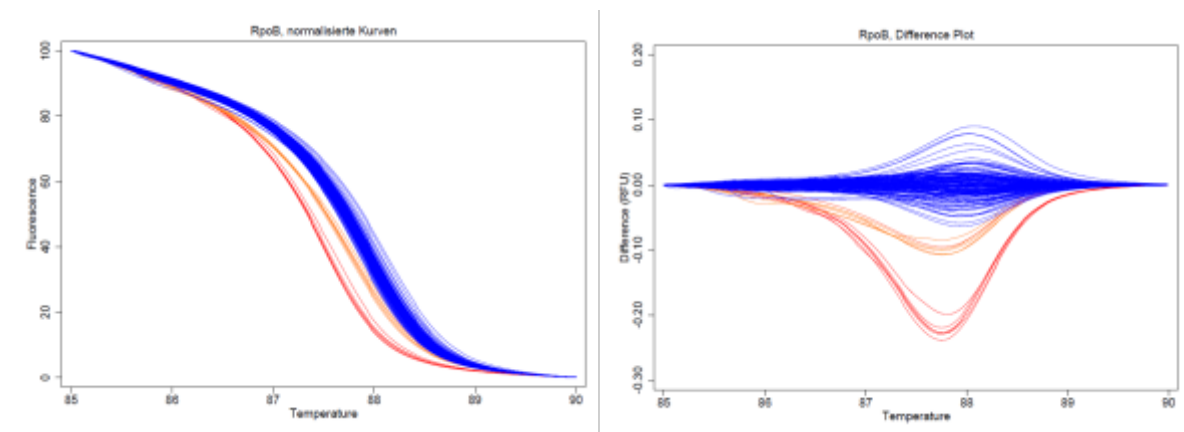


Abbildung 23: Das Primerpaar 1, geprüft mit allen Feldstämmen (28 *Salmonella* Enteritidis und 25 *Salmonella* Typhimurium) und allen vier Impfstämmen. Farblich unterschieden werden wiederum die beiden LAH-Impfstämme (*Salmonella* Enteritidis: rot, *Salmonella* Typhimurium: orange) sowie die Feldstämmen (blau). Die Proben wurden im Dreifachansatz geprüft. Gezeigt werden die normalisierten Kurven (links) sowie der Difference Plot (rechts). Als Referenzstamm wurde ein Feldstamm verwendet. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programmes Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA) erstellt.

3.1.4 Gerätevergleich

Durch einen Gerätevergleich mit den HRM-geeigneten real-time PCR Geräten LightCycler® 480 und Rotor-Gene Q sollte ausgeprüft werden, ob die LAH-Impfstämme mit der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Methode auch auf anderen Geräten differenziert werden können.

LightCycler® 480:

Geprüft wurden die vier Impfstämme, 13 *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme und 13 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme.

Betrachtete man hier zunächst das Ergebnis des LAH-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes, so zeigte sich, dass die Schmelzkurven klar von den übrigen abgegrenzt sind.

Anders stellte sich die Situation für den LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm dar. Dessen Kurven wurden durch die übrigen Kurven überlagert und waren daher nicht mehr von diesen zu unterscheiden. Dies war durch eine insgesamt größere Varianz der Schmelzkurven der Feldisolate bedingt.

Der Schmelzbereich lag zwischen 86 °C und 89 °C. Abbildung 24 zeigt die Schmelzkurven auf dem LightCycler480.

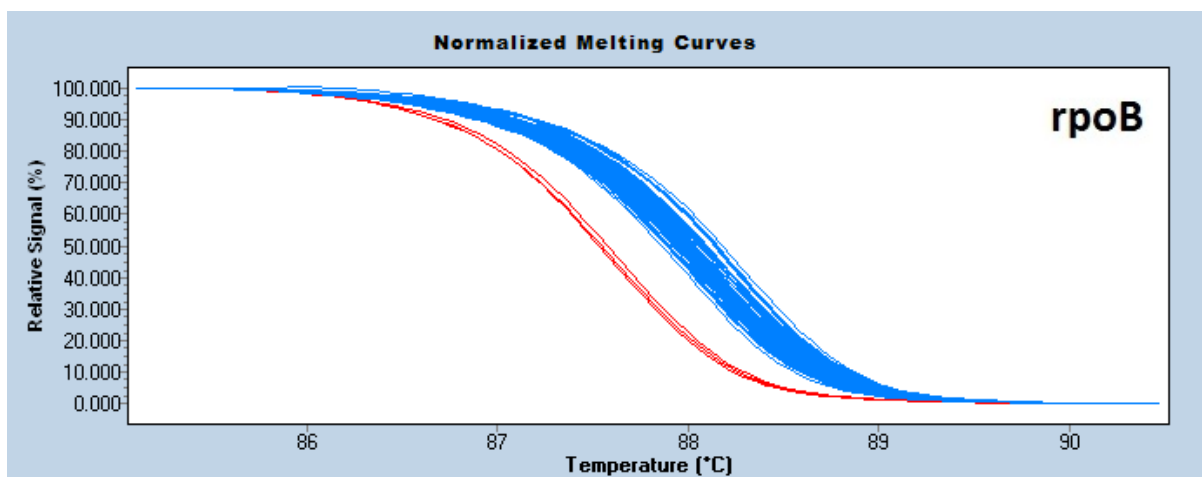


Abbildung 24: Ergebnis auf dem LightCycler® 480. Zu sehen sind die verwendeten Proben im Dreifachansatz. Es können nur die Kurven des *Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes (rot) sowie die der übrigen verwendeten Proben (blau) unterschieden werden. Abbildung wurde aus dem mitgelieferten Softwareprogramm LightCycler® 480 SW 1.5 übernommen.

Rotor-Gene Q:

Die Abbildung 25 zeigt das Ergebnis des Rotor-Gene Q. Der Lauf wurde mit allen vier Impfstämmen, jedoch nur mit neun *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämmen und neun *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämmen durchgeführt. Hier konnten sowohl der LAH-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm, als auch der LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm von den übrigen Proben unterschieden werden. Wiederum zeigte *Salmonella* Enteritidis entsprechend der besseren SNP Kategorie die deutlich größere Schmelzkurvenverschiebung.

Der Schmelzbereich lag hier in einem Bereich zwischen 83 °C und 87 °C.

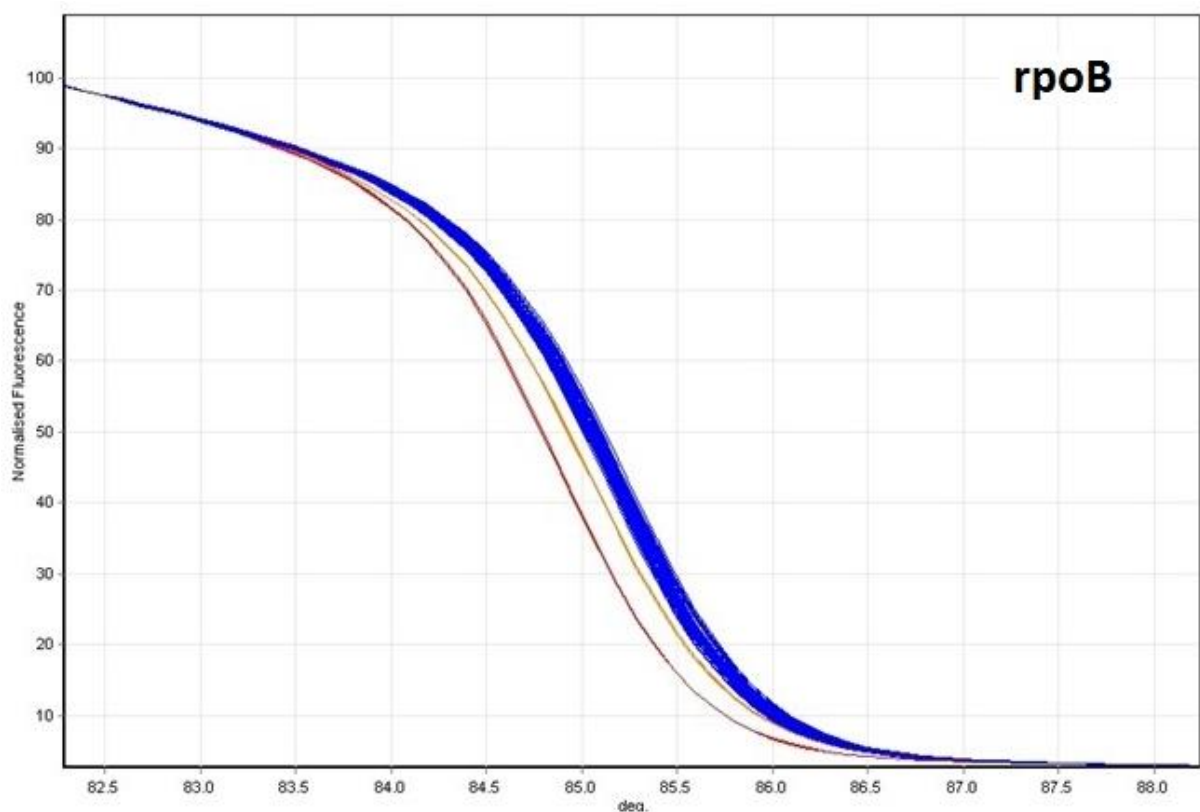


Abbildung 25: *rpoB*-HRM-Ergebnis auf dem Rotor-Gene Q. Zu sehen sind die Schmelzkurven des LAH-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes (rot), des LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes (orange) sowie die der übrigen verwendeten Proben bestehend aus den IDT-Impfstämmen und den Feldstämmen (blau). Die Abbildung wurde aus dem Programm Rotor-Gene Series Software 2.1 des Rotor-Gene Q übernommen.

Zusätzlich zeigte die Software des Rotor-Gene Q einen Confidence Wert (Tabelle 53) an. Dieser gibt an, mit welcher prozentualen Sicherheit die beiden LAH-Impfstämme von den Feldstämmen abgegrenzt werden können

Tabelle 53: Der Confidence Wert zeigt an, dass beide SNPs eindeutig von den übrigen verwendeten Proben unterschieden werden können. Hierzu müssen die beiden SNPs als definierte Genotypen markiert werden. Alle übrigen Proben werden als Variationen erkannt und mit der durch den Confidence Wert beschriebenen Sicherheit von diesen unterschieden.

Name	Genotyp	Confidence %
S. Typhimurium (Impfstamm LOH)	SNP1	99,96
S. Typhimurium (Impfstamm LOH)	SNP1	99,93
S. Typhimurium (Impfstamm LOH)	SNP1	99,98
S. Enteritidis (Impfstamm LOH)	SNP2	99,95
S. Enteritidis (Impfstamm LOH)	SNP2	99,97
S. Enteritidis (Impfstamm LOH)	SNP2	99,86
S. Typhimurium (Impfstamm IDT)	Variation	
S. Enteritidis (Impfstamm IDT)	Variation	
S.-Enteritidis-Feldstamm	Variation	
S.-Typhimurium-Feldstamm	Variation	

3.2 IDT-Impfstämme

In diesem Teil sollen die Ergebnisse der Versuche aufgezeigt werden, die unter Verwendung der IDT-Impfstämme für *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium durchgeführt wurden.

3.2.1 Sequenzierung von *purA* und *purB*

Für *purA* und *purB* wurde jeweils das komplette Gen von 1299 bp (*purA*), bzw. 1371 bp (*purB*) in insgesamt drei PCR Läufen sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit den Referenzstämmen *Salmonella*-Typhimurium-str.14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1) und *Salmonella*-Enteritidis-str.EC20111175 (Gendatenbank-Sequenznummer CP007252.1) verglichen. Hierbei zeigten sich aber keine Mutationen im Vergleich zu den bekannten Stämmen. Dies gilt für beide Impfstämme und sowohl für *purA* als auch für *purB*.

3.2.2 Sequenzierung des *his*-Genkomplexes

Für die komplette Sequenzierung aller *his*-Genabschnitte mussten insgesamt elf PCR Läufe durchgeführt werden. Hierbei konnten für beide IDT-Impfstämme 1035 Basen (*hisG*), 1305 Basen (*hisD*), 1080 Basen (*hisC*), 1068 Basen (*hisB*), 594 Basen (*hisH*), 738 Basen (*hisA*), 777 Basen (*hisF*) sowie 612 Basen (*hisI*) sequenziert werden. Diese wurden anschließend in FASTA mit den Sequenzen der Referenzstämme verglichen. So konnten die im Folgenden beschriebenen Veränderungen entdeckt werden.

Insgesamt wurden vier Punktmutationen entdeckt. Diese verteilten sich ungleich auf die beiden IDT-Impfstämme. So wurde bei *Salmonella* Typhimurium lediglich eine Mutation im Bereich *hisH* gefunden, wogegen *Salmonella* Enteritidis jeweils eine Mutation in den Bereichen *hisG*, *hisC* und *hisB* besitzen. In Abbildung 26 wird die Lage der durch Sequenzierung gefundenen Mutationen gezeigt.

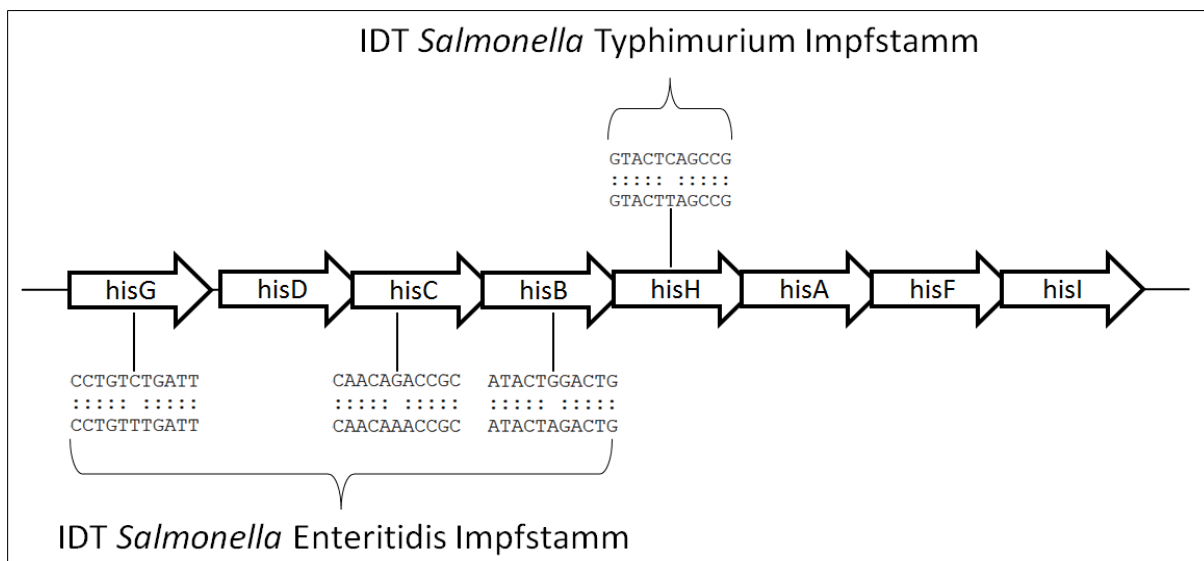


Abbildung 26: Lage der Mutationen der IDT-Impfstämme im *his*-Genkomplex.

Anschließend wurden die einzelnen Mutationen auf ihre Eignung für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung mittels HRM-Analyse geprüft.

Bei der einzigen Mutation, die beim IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm im *hisH*-Gen gefunden wurde, handelt es sich um einen SNP der Klasse 1 (C/T), der besonders für eine HRM-Analyse geeignet ist. Des Weiteren stellt er eine signifikante Veränderung der Funktionalität dar, da er, wie in Abbildung 27 dargestellt, das vorhandene Triplet in ein Stopcodon umwandelt und somit zu einem Abbruch bei der Synthese des kodierten Proteins führt.

	10	20	30	40	50	60	70	80
Impf	VMNVVILDTGCANLSSVKS	SAVARHGYTPVVSREAEIVLRADKLF	LP	PGVGTAA	MDQLRERELIDLIKACT*	PVLGICLG		

Feld	VMNVVILDTGCANLSSVKS	SAVARHGYTPVVSREAEIVLRADKLF	LP	PGVGTAA	MDQLRERELIDLIKACTQ	PVLGICLG		

	10	20	30	40	50	60	70	80
	90	100	110	120	130	140	150	160
Impf	MQLLGRRSEETR	GVDLLNIEQDV	PKMTDFGLPL	PHMGWNRVYP	QAGNRLFQ	GIEDGAYFYFVHSYAMPVNPWTIAQCNY		

Feld	MQLLGRRSEETR	GVDLLNIEQDV	PKMTDFGLPL	PHMGWNRVYP	QAGNRLFQ	GIEDGAYFYFVHSYAMPVNPWTIAQCNY		

	90	100	110	120	130	140	150	160
	170	180	190					
Impf	GEPFTA	AVQKDNFFGVQFHPERSGAAGAQLLKNFLEM*						

Feld	GEPFTA	AVQKDNFFGVQFHPERSGAAGAQLLKNFLEM*						

	170	180	190					

Abbildung 27: Vergleich der kompletten Aminosäuresequenz von *hisH*, die bei IDT-*Salmonella*-Typhimurium-(Impf)stamm und (Feld)stamm kodiert werden. Der Impfstamm zeigt einen Abbruch bei Position 72. Für das Alignment wurde der Feldstamm *Salmonella*-Typhimurium-str.14028S (Gendatenbank-Sequenznummer NC_016856.1) verwendet.

Den bedeutenden Unterschied dieser Mutation zeigt Abbildung 28. Wie dort zu sehen ist, kann vermutlich nur ein Bruchteil des eigentlichen Proteins gebildet werden.

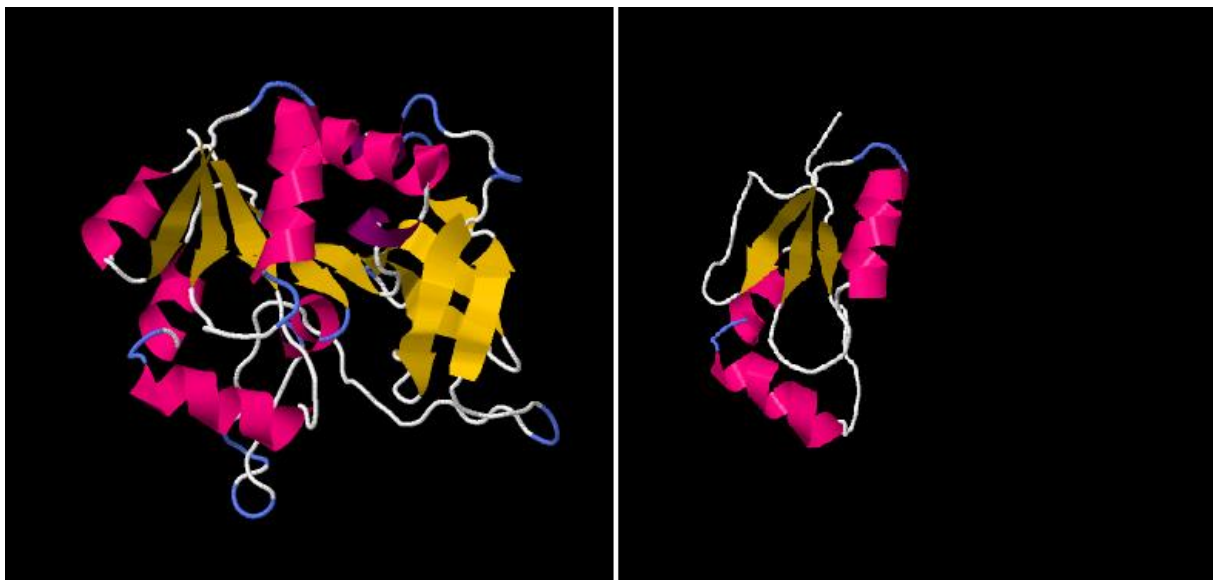


Abbildung 28: Vergleich des durch *hisH* kodierten Proteins eines Feldstammes (links) sowie des Impfstammes (rechts), unter der Annahme dass die beiden Proteine jeweils bis zum ersten Stopcodon gebildet werden. Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms Phyre2 (KELLEY & STERNBERG, 2009) angefertigt.

Im Falle des IDT-Salmonella-Enteritidis-Impfstammes wurden drei Mutationen, verteilt auf die Abschnitte *hisG*, *hisC* sowie *hisB*, gefunden. Auch hier handelte es sich bei allen drei Mutationen um SNPs der Klasse 1. Die Mutation im Bereich *hisG* ist eine Veränderung der Base C zu T. Dies bedeutet für die Aminosäuresequenz aber keinen Unterschied, da das ursprüngliche Triplet TTT ebenfalls, wie das mutierte Triplet TTT, die Aminosäure Leucin kodiert. Ähnlich verhält es sich für die Mutation von *hisC*. Hier wird G zu A getauscht. Das ursprüngliche Triplet lautet hier demnach CAG, das mutierte CAA. Beide kodieren die Aminosäure Glutamin. Die Mutation im Abschnitt *hisB* ist ein Austausch der Base G zu A. Dies bedeutet eine Veränderung von Glycin (GGA) zu Arginin (AGA). Betrachtet man den pH-Wert und die Ladung/Polarität dieser beiden Aminosäuren, zeigt sich Glycin neutral und unpolar, Arginin hingegen basisch und geladen polar.

Für die HRM-Analyse wurde letztlich die Mutation in Abschnitt *hisB* gewählt, da diese im Gegensatz zu den anderen beiden gefundenen SNPs eine Veränderung der Proteinzusammensetzung in Form eines Aminosäuren-Austausches aufweist (siehe Abbildung 29)

	10	20	30	40	50	60	70	80
Impf	MSQKYLFI	DRDGT	LISEPP	SDFQV	DRFDK	LAFEPE	VI	PVLLKLQKAGFKLV

Feld	MSQKYLFI	DRDGT	LISEPP	SDFQV	DRFDK	LAFEPE	VI	PVLLKLQKAGFKLV

	90	100	110	120	130	140	150	160
Impf	TSQGVCF	DEVLI	CPHLP	ADDCD	CRKPK	VKLVE	RYLA	EQAMDS

Feld	TSQGVCF	DEVLI	CPHLP	ADDCD	CRKPK	VKLVE	RYLA	EQAMDS

	170	180	190	200	210	220	230	240
Impf	QLTKRDR	YAHVIR	NTKETQ	IDVSV	WLDRE	GN	SKINTG	VGVFFD

Feld	QLTKRDR	YAHVIR	NTKETQ	IDVSV	WLDRE	GN	SKINTG	VGVFFD

	250	260	270	280	290	300	310	320
Impf	EALKLAL	GDKRG	ICRFG	VLPMD	ECLAR	CALDIS	GRPHLE	YKAEFTY

Feld	EALKLAL	GDKRG	ICRFG	VLPMD	ECLAR	CALDIS	GRPHLE	YKAEFTY

	330	340	350					
Impf	NDHHRV	ESLFKA	FGRTL	RQAIR	VEGDT	LPSSK	GVL*	
	
Feld	NDHHRV	ESLFKA	FGRTL	RQAIR	VEGDT	LPSSK	GVL*	
	

Abbildung 29: Vergleich der kompletten Aminosäuresequenz von *hisB*, die bei IDT-*Salmonella*-Enteritidis-(Impf)stamm und (Feld)stamm kodiert werden. Der Impfstamm zeigt einen Austausch bei Position 236. Für das Alignment wurde der Feldstamm *Salmonella*-Enteritidis-str.EC20111175 (Gendatenbank-Sequenznummer CP007252.1) verwendet.

3.2.3 Validierung mit allen Proben

Aufgrund der im vorangegangenen Kapitel besprochenen Ergebnisse der Sequenzierung wurden Primer für die HRM-Analyse erstellt. Diese wurden in zwei HRM-Läufen (je ein Lauf mit den *Salmonella*-Typhimurium- bzw. *Salmonella*-Enteritidis-Proben) mit den jeweiligen, in Kapitel III.2.3 dargestellten, Stämmen geprüft. In beiden Fällen sind die IDT-Impfstämme eindeutig anhand ihrer Schmelzkurve von den Feldstämmen (inkl. der LAH-Impfstämme) abgrenzbar (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31).

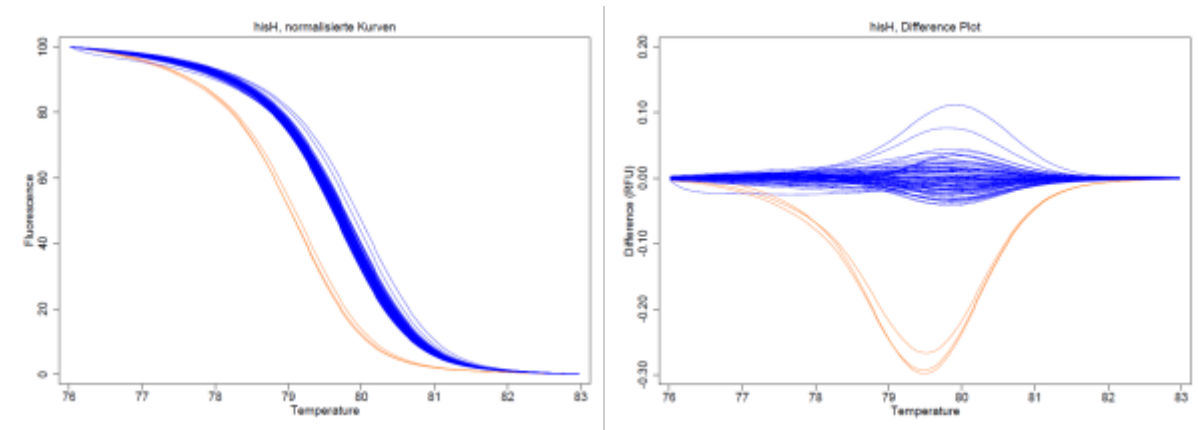


Abbildung 30: HRM-Ergebnis für den IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm (orange), geprüft gegen 25 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme (blau). Jede Probe wurde im Dreifachansatz geprüft. Gezeigt werden die normalisierten Kurven (links), sowie der Difference Plot (rechts). Als Referenzstamm für den Difference Plot wurde ein Feldstamm gewählt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA).

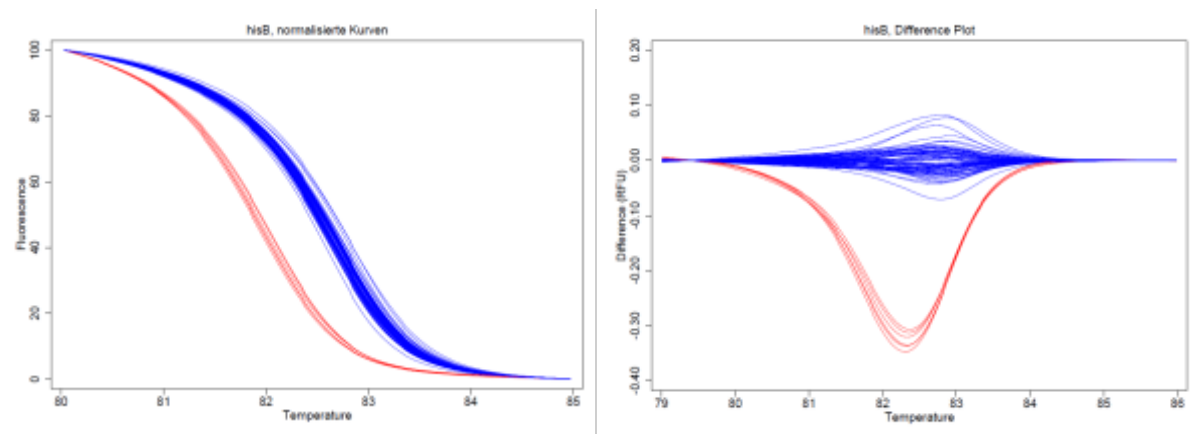


Abbildung 31: Ergebnis für den IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm (rot), geprüft gegen 28 *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme (blau). Die Proben wurden im Dreifachansatz geprüft. Dargestellt sind die normalisierten Kurven (links), sowie der Difference Plot (rechts). Als Referenz für den Difference Plot wurde ein Feldstamm gewählt. Die Abbildungen wurden unter Verwendung des Programmes Stata12 (StataCorp LP, Texas, USA) angefertigt.

3.2.4 Gerätevergleich

Durch einen Gerätevergleich mit den HRM-geeigneten real-time PCR Geräten LightCycler® 480 und Rotor-Gene Q sollte ausgeprüft werden, ob die IDT-Impfstämme mit der im vorherigen Kapitel beschriebenen Methode auch auf anderen Geräten differenziert werden können.

LightCycler® 480:

Geprüft wurden die vier Impfstämme, 13 *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämme und 13 *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämme.

Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen die Ergebnisse. Sowohl der IDT-*Salmonella*-Enteritidis- als auch der IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm waren eindeutig von den übrigen verwendeten Proben abgrenzbar. Die ebenfalls geprüften LAH-Impfstämme zeigten die gleiche Schmelzkurve wie die Feldstämme. Betrachtet man den Schmelzbereich, so lag dieser bei *Salmonella* Enteritidis bei einer Temperatur zwischen 80 °C und 85 °C, bei *Salmonella* Typhimurium hingegen etwas niedriger zwischen 76 °C und 83 °C.

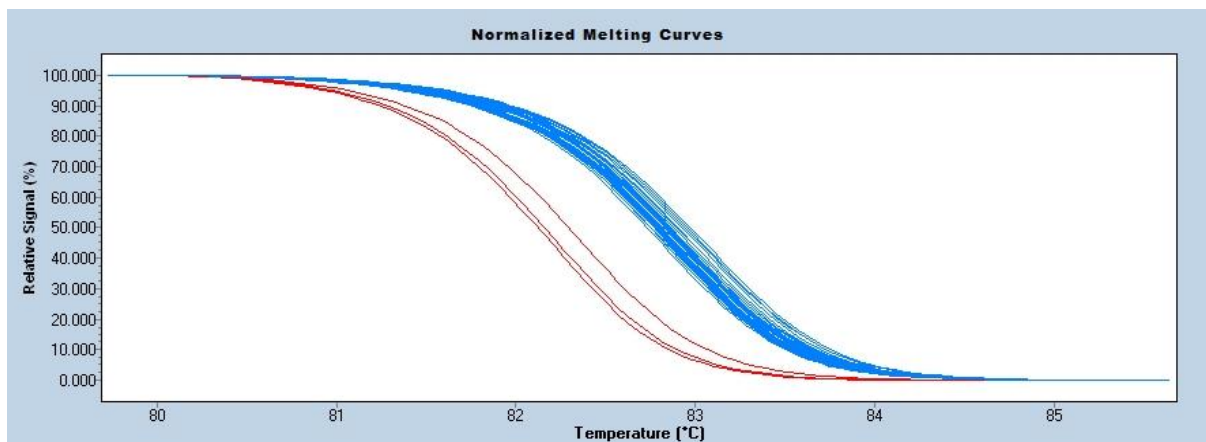


Abbildung 32: Ergebnis auf dem LightCycler® 480. Zu sehen sind die verwendeten Proben im Dreifachansatz. Es können die Kurven des IDT-Salmonella-Enteritidis-Impfstammes (rot) von den übrigen verwendeten Proben (blau) gut unterschieden werden. Abbildung wurde aus dem mitgelieferten Softwareprogramm LightCycler® 480 SW 1.5 übernommen.

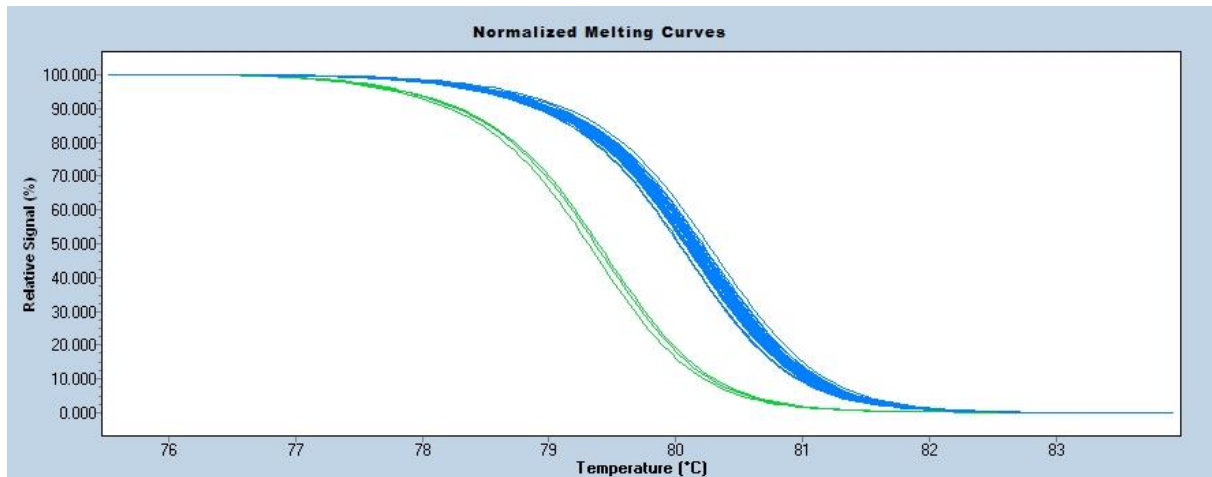


Abbildung 33: Ergebnis auf dem LightCycler® 480. Zu sehen sind die verwendeten Proben im Dreifachansatz. Die Kurven des IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes (grün) können eindeutig von den übrigen verwendeten Proben (blau) abgegrenzt werden. Abbildung wurde aus dem mitgelieferten Softwareprogramm LightCycler® 480 SW 1.5 übernommen.

Rotor-Gene Q:

Hier wurde der Lauf mit allen vier Impfstämmen, neun *Salmonella*-Enteritidis-Feldstämmen und neun *Salmonella*-Typhimurium-Feldstämmen durchgeführt.

Abbildung 34 und Abbildung 35 stellen das Ergebnis des Rotor-Gene Q dar. Es konnten wiederum sowohl der LAH-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm, als auch der LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm von den übrigen Proben unterschieden werden. Der Schmelzbereich lag bei *Salmonella* Typhimurium zwischen 75 °C und 80 °C. Der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm bewegte sich zwischen 77 °C und 82,5 °C.

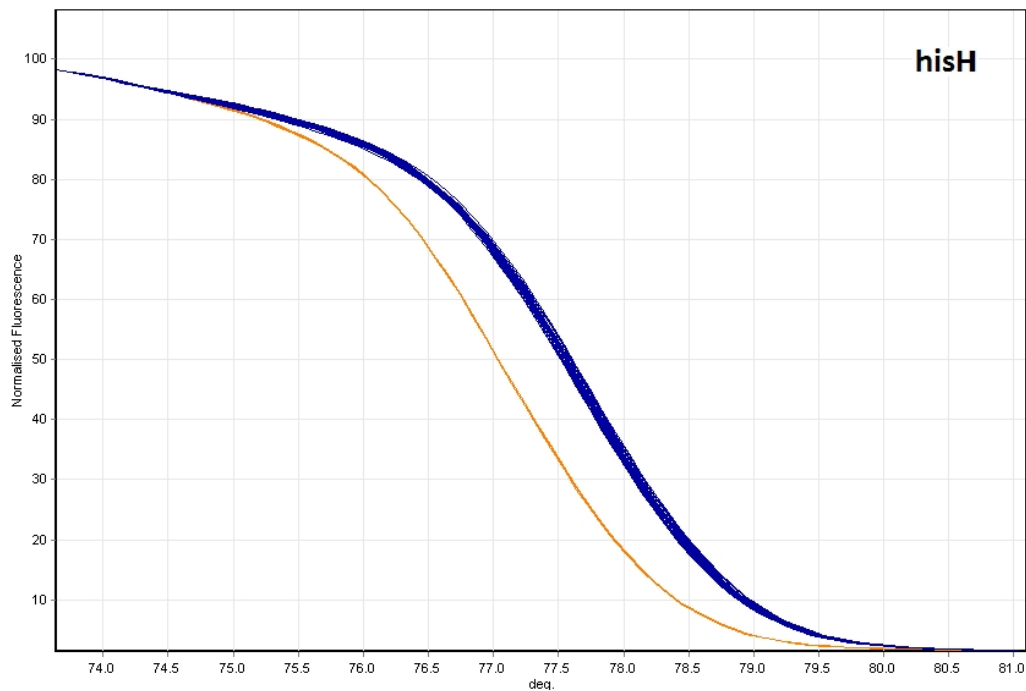


Abbildung 34: Das Ergebnis auf dem Rotor-Gene Q. Zu sehen sind die Schmelzkurven des IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes (orange) und die der übrigen verwendeten Proben bestehend aus den LAH-Impfstämmen und den Feldstämmen (blau). Die Abbildung wurde aus dem Programm Rotor-Gene Series Software 2.1 des Rotor-Gene Q übernommen.

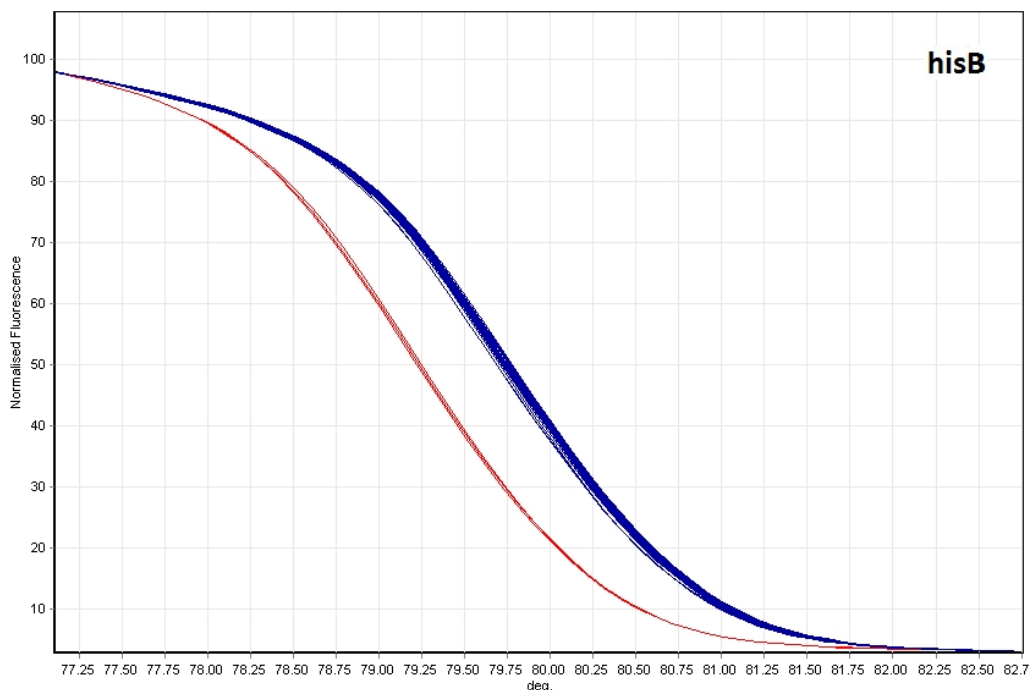


Abbildung 35: Gezeigt werden die Schmelzkurven des IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes (rot) und die der übrigen verwendeten Proben bestehend aus den LAH-Impfstämmen und den Feldstämmen (blau) auf dem Rotor-Gene Q. Die Abbildung wurde aus dem Programm Rotor-Gene Series Software 2.1 des Rotor-Gene Q übernommen.

V DISKUSSION

1 SYBR-Green Multiplex PCR nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011

Ziel der Untersuchung war es, die Möglichkeit einer molekularbiologischen Differenzierungsmethode für *Salmonella*-Serovare zu prüfen. Hierfür wurden die SYBR-Green Multiplex PCRs der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 ausgewählt. Diese Publikation enthält insgesamt drei Multiplex PCRs (PCR I, PCR II-G1 und PCR II-G3) und wurde speziell für die Salmonellen-Serovar-Differenzierung entwickelt. Dies geschah jedoch nur unter Verwendung zehn ausgewählter Serovare und nicht jedes Serovar wurde dort mit allen drei Multiplex PCRs untersucht. Im eigenen Versuch wurde das zu prüfende Spektrum erheblich erweitert. Insgesamt 210 Isolate bestehend aus 31 Serovaren wurden in allen drei Multiplex PCRs geprüft (siehe Anhang 1-4).

Obwohl die gleichen Reagenzien und das gleiche Thermoprofil wie bei der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 verwendet wurden, wurde eine Schmelzpunktverschiebung von $\sim 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ für jede der drei Multiplex-PCRs bei allen Proben beobachtet. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass für die hier dargestellten Untersuchungen nur der Mx3000p® zur Verfügung stand, wohingegen in der Publikation ein 7300-Real-Time PCR System verwendet wurde. Obwohl beide Systeme Peltier-Elemente für die Temperatur-Regulierung verwenden und die Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffs mit Hilfe einer Halogen-Lampe für jede Probe einzeln erfolgt, muss der Grund für die Verschiebung der Schmelzpunkte aufgrund des sonst gleichen Versuchsaufbau trotzdem die Verwendung unterschiedlicher real-time Geräte sein. Derartige, gerätebezogene Unterschiede wurden auch in einer anderen Publikation beschrieben (SCHODER et al., 2005; HERRMANN et al., 2006; HERRMANN et al., 2007; STEPHENS et al., 2010). Auch hier zeigten ähnliche Geräte unterschiedliche Ergebnisse. Als Hauptfaktoren für eine unterschiedliche Auflösung wurde dort auf die Temperaturkontrolle, Temperaturmessung sowie die Fluoreszenzmessung verwiesen. Da die vorliegenden Schmelzpunktverschiebungen aber für das jeweilige Gerät bei allen Proben und PCRs konstant auftraten, war die Auswertbarkeit des Assays in den eigenen Ergebnissen nicht eingeschränkt.

PCR I:

Insgesamt wurden in der PCR I fünf Primerpaare untersucht (FliC-i, FloR, Sdr, FliC-g und FliC/FljB-1). Hier stellte die Überschneidung der Schmelzpunkte bei FloR und Sdr sowie die (bis auf ein Basenpaar) gleiche Produktgröße bei FliC-i, FloR und Sdr ein Problem für die Differenzierung dar. Insbesondere entstand dieses Problem, da FloR und Sdr somit weder anhand des Schmelzpunktes, noch durch die Gelelektrophorese differenziert werden konnten. Dies konnte jedoch durch eine Streichung von FloR aus dem Versuchsaufbau gelöst werden. Die Streichung war nicht mit einer Minderung der Potenz für die Serovar-Differenzierung gleich zu setzten, da es sich bei *floR* um ein Multiresistenzgen handelt, welches bei mehreren *Salmonella*-Serovaren anzutreffen ist (DOUBLET et al., 2005). Somit erhält man durch das FloR-Primerpaar, zwar eine interessante Zusatzinformation über die Virulenz der jeweiligen Probe, aber keine serovarspezifischen Informationen. Zum alleinigen Zwecke der Serovar-Differenzierung konnte also das FloR-Primerpaar aus dem Versuchsaufbau gestrichen werden. Somit konnte die Problematik der nahen Schmelzpunkte von FloR und Sdr gelöst werden. Von diesem Punkt abgesehen konnte man die Aussage treffen, dass die PCR I der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 entsprechend funktionierte und eine erste Einteilung von unbekannten Isolaten in grobe Gruppen (A-E) ermöglichte (siehe Anhang 4). Hier zeigten in etwa die Hälfte der geprüften Serovare ein Produkt und konnten anhand dieses in eine der Gruppen A-D einsortiert werden. Die andere Hälfte hingegen zeigte bei keinem der verwendeten Primerpaare ein Produkt und wurde der dafür geschaffenen Gruppe E zugewiesen. Die weitere Differenzierung der Proben der Gruppe E war besonders interessant, da der originale Multiplex PCR Aufbau (RAJTAK et al., 2011) bei einem negativen Ergebnis der PCR I keine weiteren Untersuchungen vorsah. Durch die hier durchgeführte Erweiterung der Differenzierung konnten jedoch, wie im Weiteren beschrieben, zusätzliche Informationen für die Serovar-Differenzierung gewonnen werden.

PCR II-G1:

Die PCR II-G1 war von allen drei PCRs am besten auszuwerten. Alle Proben lieferten gute Ergebnisse, da sie anhand ihrer Schmelzpunkte gut zu unterscheiden waren. Durch diese PCR konnte die Auswahl an möglichen Serovaren bei einer unbekannten Probe weiter eingegrenzt werden. Hier waren die Differenzierungen in den Gruppen A und E besonders von Belang (Anhang 4). Bei Gruppe A konnten hier bereits drei (*Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Ohio) der geprüften Serovare eindeutig identifiziert werden. Dies lag darin begründet, dass der originale Aufbau (RAJTAK et al., 2011) genau die Unterscheidung

dieser Serovare vorsah und dies auch durch die Hinzunahme weiterer Serovare nicht beeinträchtigt wurde. Im Falle der Gruppe E wurden, wie bereits erwähnt, für die dort eingruppierten Serovare im originalen Aufbau (RAJTAK et al., 2011) keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Allerdings zeigte sich, dass die Gruppe E durch die Ergebnisse der PCR II-G1 weiter in drei Untergruppen aufgeteilt werden konnte (Anhang 4).

PCR II-G3:

Ein großer Nachteil der PCR II-G3 war, dass sich die drei amplifizierten Produkte in ihrem Schmelzverhalten so ähnelten, dass sich die Ergebnisse zum Teil überschneiden. So lag der Schmelzbereich für FljB(z6) bei 80,2 - 81,3 °C, der von FljB-1,2/1,5 bei 81,2 - 84,8 °C und der von Spv bei 78,5 - 81,3 °C. Insbesondere für die Produkte im mittleren Bereich (~80 - 82 °C) war eine sichere Unterscheidung nur mit Hilfe der Gelelektrophorese möglich. Dies war bei den Ergebnissen in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 nicht der Fall. Dort zeigten die einzelnen Schmelzbereiche keine so breite Schwankung. Allerdings wurden dort lediglich zehn Proben der Serovare *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Kentucky in der PCR II-G3 geprüft. Die eigenen Ergebnisse hingegen bezogen die Daten aller 210 geprüften Proben mit ein. Eine größere Varianz im Schmelzverhalten war dadurch, in Verbindung mit den unterschiedlichen verwendeten Geräten, erklärbar.

Eine weitere Auffälligkeit bei den geprüften Stämmen zeigte das Serovar *Salmonella* Typhimurium. Dieses lieferte variable Ergebnisse. So fanden sich Proben mit nur einem Produkt (FljB(1,2),FljB(1,5)), zwei Produkten (FljB(1,2),FljB(1,5) und SpV) oder gar keinem Produkt. Dies war ähnlich den in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 beschriebenen Ergebnissen. Dort wurden jedoch nur die Möglichkeiten mit zwei oder keinem Produkt gezeigt. Diese Varianz der *Salmonella*-Typhimurium-Proben schränkten die eigene Auswertung nicht ein, da in allen drei Fällen das Serovar eindeutig zugeordnet werden konnte. Dies ist der Fall, da *Salmonella* Typhimurium (nach der vorangegangenen Gruppierung anhand der anderen beiden Multiplex-PCRs) das einzige Serovar in Gruppe C war, dass ein Produkt mit dem Primerpaar FljB(1,2),FljB(1,5) lieferte (siehe Anhang 4). Somit konnten die Proben mit einem oder beiden Produkten eindeutig diesem Serovar zugeordnet werden. Das Fehlen des SpV Produktes bei manchen *Salmonella*-Typhimurium-Proben konnte damit erklärt werden, dass es sich bei *spv* um einen Genabschnitt handelt, der nur auf einem Virulenzplasmid vorkommt. Dieses wiederum kann bei manchen *Salmonella*-Typhimurium-Isolaten fehlen (CHIU et al., 1999). Die Proben, die gar kein Produkt lieferten, konnten hingegen als monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)

durch Serovar-Agglutination bestätigt werden. Da auch diese Proben, in Verbindung mit den Reaktionen aus den anderen beiden PCRs, einzigartige Ergebnisse lieferten, konnten auch diese Proben eindeutig eingeteilt werden.

Die eigentliche, in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 angedachte Abgrenzung von *Salmonella* Typhimurium zu *Salmonella* Kentucky blieb erhalten, da *Salmonella* Kentucky (im Gegensatz zu *Salmonella* Typhimurium) das einzige Serovar in Gruppe C war, dass ein Produkt mit dem Primerpaar FljB(z6) zeigte. Die beschriebene Schmelzpunktüberschneidung ist hier kein Hindernis bei der Differenzierung der beiden Serovare, da sich diese nur im Vergleich mit Proben aus anderen Gruppen zeigte. Betrachtete man also nur die aus der vorherigen Differenzierung in Gruppe C eingeteilten Serovare (*Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Kentucky) waren diese gut zu unterscheiden.

Somit konnte die Aussage getroffen werden, dass die PCR II-G3, so wie im originalen Aufbau der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 vorgesehen, auch in den eigenen Ergebnissen gut für die Unterscheidung der Serovare *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Kentucky geeignet war. Sie lieferte zudem weitere Informationen, die eine bessere Differenzierung, insbesondere der in Gruppe F eingeteilten Proben, ermöglichte. Um diese zusätzlichen Informationen zu erhalten, musste jedoch entweder die Gelelektrophorese mitverwendet werden oder die Zielgene mussten in Singleplex PCRs detektiert werden.

Fazit:

Es muss beachtet werden, dass sich die Autoren der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 bei der Versuchsdurchführung strikt an das Prinzip gehalten haben, wonach der jeweilige Stamm zunächst ein Produkt in der PCR I zeigen musste, andernfalls wurde das Serovar nicht weiter untersucht. Durch die Erweiterung des Versuchsaufbaus, in dem alle eigenen Proben in allen Multiplex-PCRs geprüft wurden, konnten bedeutend mehr Informationen erlangt werden. So zeigten die eigenen Ergebnisse, dass mit Hilfe der SYBR-Green Multiplex-PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 folgende Serovare anhand der Schmelzpunkte eindeutig identifiziert werden konnten: *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-), *Salmonella* Subspezies IIb sowie *Salmonella* Enteritidis. Außerdem konnte der IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm durch eine charakteristische, schwache Kurve in der PCR II G-3 ebenfalls eindeutig identifiziert werden. Die übrigen drei Impfstämme konnten jedoch mit dieser Methode nicht unterschieden

werden. Zusätzlich konnten folgende Serovare, die sowohl in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 als auch im eigenen Aufbau verwendet wurden, zumindest näher eingegrenzt werden: *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Kottbus, *Salmonella* Virchow. Dies war allerdings nur in Verbindung mit einer Gelelektrophorese für die PCR II-G3 möglich und ermöglichte auch keine eindeutige Identifizierung dieser Serovare, da sie identische Produkte wie andere Serovare hervorbrachten. Es war jedoch möglich die Auswahl bei einer unbekannten Probe auf zwei (*Salmonella* Dublin, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Virchow) beziehungsweise fünf (*Salmonella* Kottbus) mögliche Serovare einzugrenzen (Anhang 4).

Die eigenen Ergebnisse zeigten folglich, dass, anhand der Varianz der unterschiedlichen Zielgene in allen drei PCRs, ein Schema spezifische Ergebnisse liefern konnte (Anhang 4) und somit alle drei PCRs durchgeführt werden sollten. Allerdings war auch dann nur für die bereits genannten Serovare eine endgültige Serovar-Bestimmung möglich. Für alle weiteren Serovare konnte nur eine Einteilung in Gruppen erfolgen. Dies könnte bei bestimmten Fragestellungen, wo es nur um eine konkrete Unterscheidung zweier oder weniger Serovare geht, dennoch hilfreich sein. Es muss jedoch ebenso darauf hingewiesen werden, dass diese Aussagen nur für die verwendeten, laborspezifisch häufig auftretenden Serovare getroffen werden können. Eine weitere Verwendung mit anderen Serovaren könnte zu abweichenden Ergebnissen führen.

2 HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011

Einen zweiten Ansatz für die molekularbiologische Serovar-Differenzierung stellte das High Resolution Melting dar. Hierbei erschien die HRM-Analyse nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 geeignet, da dort bereits alle 20 untersuchten Serovare, mit der Ausnahme von *Salmonella* Glostrup und *Salmonella* Hadar, identifiziert werden konnten. Der Aufbau setzte sich aus insgesamt acht Primerpaaren zusammen, die jeweils mit allen ausgewählten Proben geprüft werden sollten. Es wurden daher aufgrund veterinärmedizinischer und seuchenrechtlicher Aspekte 100 eigene Isolate, verteilt auf 21 Serovare, ausgewählt und mit den acht Primerkombinationen geprüft. Dies geschah sowohl auf dem LightCycler® 96 als auch auf dem LightCycler® 480. Anschließend wurden die gewonnenen Daten ausgewertet und die 100 *Salmonella*-Stämme nach ihrem jeweiligen Schmelzkurvenverlauf in Gruppen eingeteilt. Zusätzlich wurden noch Möglichkeiten für eine Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Varianten monophasisch (1,4,5,12:i:-) und O5-negativ (1,4,12:i:1,2) geprüft.

Auswahl des Farbstoffes:

Bevor die eigentliche Serovar-Differenzierung durchgeführt wurde, sollte im Vorfeld der für diese Untersuchung auf dem vorhandenen Gerät (LightCycler® 480) am besten geeignete Farbstoff ermittelt werden. Hierzu wurden drei Möglichkeiten (MeltDoctor™ HRM Master Mix, LightCycler® 480 High Resolution Melting Master und SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain) geprüft. Ähnliche Vergleiche wurden für die Farbstoffe MeltDoctor™ HRM Master Mix und LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (ROYO et al., 2011) beziehungsweise LightCycler® 480 High Resolution Melting Master und SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (UGO et al., 2010) bereits durchgeführt.

Der MeltDoctor™ HRM Master Mix lieferte im Vergleich zu den beiden anderen Reagenzien die deutlich schlechtesten Ergebnisse. Dies zeigte sich in allen drei geprüften Zielgenen in einem unsteten, gezackten Kurvenverlauf sowie niedrigen absoluten und relativen Fluoreszenzwerten. Der Farbstoff erwies sich daher für die geplanten Untersuchungen als ungeeignet. Dieses Ergebnis ist insofern verwunderlich, da verschiedene andere Autoren gute Ergebnisse mit dem MeltDoctor™ HRM Master Mix erzielen konnten (ROYO et al., 2011; GURTLE et al., 2012; MARQUEZ et al., 2012). Es wurde sogar in einer der Publikationen explizit der MeltDoctor™ HRM Master Mix einem SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain Mix vorgezogen. Dies wurde damit begründet, dass der MeltDoctor™ HRM Master Mix eine stabilisierte und somit verbesserte Form des SYTO® 9 Farbstoffes enthält (GURTLE et al., 2012). Eine mögliche Ursache für die ungenauen Ergebnisse könnten unterschiedliche Geräte darstellen. Dies wäre für die Publikationen von Royo et al. aus dem Jahr 2011 und Gurtler et al. aus dem Jahr 2012 eine gute Erklärung, da diese einen Rotor-Gene Q beziehungsweise einen Rotor-Gene 6000 verwendeten. In einer anderen Untersuchung hingegen wurde ebenfalls ein LightCycler® 480 erfolgreich verwendet (MARQUEZ et al., 2012). In dieser Publikation wurden jedoch keine Vergleiche zu anderen Farbstoffen oder Geräten gezogen, daher bleibt die Möglichkeit bestehen, dass der dort vorgestellte Aufbau gut mit dem LightCycler® 480 durchzuführen war, wohingegen der im eigenen Versuch geprüfte Ansatz für diesen ungeeignet war.

SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain und LightCycler® 480 High Resolution Melting Master lieferten für einen Großteil der Ansätze ähnliche Ergebnisse. Allerdings zeigte sich im Falle von SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain, dass einzelne Ansätze erheblich von den anderen Replikaten abwichen. Dieses Phänomen zeigte sich bei den Zielgenen I und K. Insgesamt drei Proben lieferten erheblich höhere Fluoreszenzen als

die übrigen Proben. Ähnlich wurden die Ergebnisse des Vergleichs der beiden Farbstoffe in der Publikation von Ugo et al. aus dem Jahr 2010 beschrieben. Diese berichteten zwar nicht von einer so starken Abweichung einzelner Proben, beschrieben jedoch ebenfalls Unterschiede in der Form der Schmelzkurven. Auch hier könnte die Ursache für die Abweichungen einzelner Proben die Verwendung unterschiedlicher Geräte sein, da in der Publikation von Ugo et al. aus dem Jahr 2010 die Farbstoffe nur auf einem Gerät der passenden Firma geprüft wurden. Dies bedeutete, dass der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master nur auf dem LightCycler® 480 und der SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain nur auf einem ABI 7500 fast beziehungsweise einem ABI 7900 geprüft wurden.

Das in der Publikation von Ugo et al. aus dem Jahr 2010 dargelegte Prinzip, Farbstoff und Gerät von identischen Firmen zu wählen, spielte aber auch letztlich bei der Entscheidung für den LightCycler® 480 High Resolution Melting Master eine entscheidende Rolle. Dies lag darin begründet, dass beide für die HRM verwendeten Geräte (LightCycler® 96 und 480) von der Firma Roche hergestellt werden, wie auch der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master. Dies garantierte einen mit diesen Geräten vielfach geprüften und optimal eingestellten Farbstoff. Daher scheinen je Detektionssystem in der Regel die Reagenzien am geeignetsten zu sein, die der Hersteller vertreibt. Der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master lieferte zudem für alle Ansätze einheitliche Ergebnisse mit konstant hohem absolutem und relativem Fluoreszenzlevel. Ein weiterer Vorteil dieses Mixes gegenüber dem SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain-Reagenz ist, dass es sich hier um einen „ready to use“ Mastermix handelt. Die Handhabung ist daher wesentlich kürzer und einfacher. Außerdem wird die Gefahr von Pipettierfehlern minimiert. SYTO® 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain wurde zwar in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendet, allerdings scheint die dort publizierte Farbstoffkonzentration sehr niedrig. Dies zeigte sich auch im Vergleich zu anderen Publikationen (DO et al., 2008; GANOPOULOS et al., 2011), in denen ebenfalls ein Rotor-Gene Gerät verwendet wurde und dennoch ein Aufbau, der deutlich mehr Farbstoff enthält, zum Einsatz kam. Da also ohnehin eine Protokoll-Anpassung notwendig war, wurde aufgrund der besseren Leistung beim Farbstoff-Vergleich der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Auswahl der optimalen Mastermix/Proben-Verhältnisses:

Andere Publikationen zeigten, dass bei molekularbiologischen Methoden eine Reduktion des Gesamtvolumens möglich war, ohne dabei schlechtere Ergebnisse zu erhalten (BAI et al., 2012; FEREIDOUNI et al., 2012). Dies wurde insbesondere auch für den gewählten Farbstoff LightCycler® 480 High Resolution Melting Master nachgewiesen (BAI et al., 2012). Daher wurde ein Versuch durchgeführt, in welchem Verhältnis Mastermix und Proben-DNS optimal zueinander stehen und in wie weit eine Gesamtvolumenreduzierung möglich war. Es wurden vier Mastermix/Proben-Verhältnisse geprüft: 18/2, 15/5, 13/2 und 8/2 µl. Hierbei erzielte das Verhältnis 13/2 µl das beste Ergebnis. Einzig 18/2 µl lieferte ähnliche Werte, wurde jedoch aufgrund des höheren Mastermix-Verbrauches und den damit verbundenen höheren Kosten verworfen. Eine erfolgreiche Reduktion auf das kostengünstigste geprüfte Verhältnis 8/2 µl wurde für den LightCycler® 480 High Resolution Melting Master beschrieben (NORAMBUENA et al., 2009). Dieses Verhältnis zeigte jedoch in den eigenen Ergebnissen etwas schlechtere Ergebnisse als 13/2 µl und 18/2 µl. Daher wurde es zwar aufgrund der Kostenersparnis in Betracht gezogen, aber wegen der schlechteren diskriminatorischen Leistung dennoch verworfen. Letztlich wurde das Verhältnis 13/2 µl gewählt, welches ebenfalls eine gute Kostenreduktion nach sich zieht und, wie bereits erwähnt, die besten Ergebnisse für den untersuchten Aufbau lieferte. Auch dieses Verhältnis wurde bereits erfolgreich mit dem LightCycler® 480 High Resolution Melting Master verwendet (DERZELLE et al., 2011).

Ergebnisse der HRM:

In der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 wurden drei unterschiedliche Gruppen von Zielgenen verwendet. Dies war zum einen eine als „short targets“ bezeichnete Gruppe bestehend aus den Zielgenen A, I und K. Diese befanden sich in variable Regionen des bakteriellen Genoms die jeweils ein Protein kodieren (A: Typ-II-Sekretion Adenosin-5'-Triphosphat bindendes Protein, I: hypothetisches Proteins, K: *fimA* Genregion). Genauere Angaben über diese Zielgene wurden in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 nicht gemacht. Das entscheidende Kriterium für die gute Eignung dieser Zielgene war jedoch die geringe Produktgröße von 127 bp, 148 bp und 105 bp, da Produkte für eine HRM-Analyse eine Größe von 300 bp nicht überschreiten sollten (DRUML & CICHNA-MARKL, 2014). Diese Zielgene zeigten sowohl in den eigenen Ergebnissen, als auch in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 die geringste Varianz. Allerdings entsprachen die Gruppeneinteilungen für den Großteil der

Proben den Serovaren.

Die zweite Zielengruppe (CR1 und CR2) bestand aus CRISPR-Regionen (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Hierbei handelte es sich um Genorte, die von wiederkehrenden Gensequenzen (Repeats) geprägt sind. Diese werden wiederum durch nicht wiederkehrende Einschübe (Spacers) unterbrochen. Diese CRISPR-Regionen sind hoch variabel (POURCEL et al., 2005). Daher sind sie in Verbindung mit einer HRM-Analyse gut für Genotypisierungen geeignet. Dies wurde nicht nur für Salmonellen (wie im Falle der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011), sondern auch für andere Bakterienspezies wie *Campylobacter jejuni* beschrieben (PRICE et al., 2007). Bei der Auswertung von CR1 und CR2 sind folgende Besonderheiten aufgefallen. CR1 zeigte bei 15 Serovaren negative Ergebnisse und lieferte damit mit Abstand die meisten negativen bzw. nicht verwertbaren Ergebnisse (ausgenommen CR_F CR1_R). Dies war in den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 ähnlich, allerdings nicht in einer so ausgeprägten Form, da hier nur fünf Serovare negative Ergebnisse lieferten. Die Frage, ob die unterschiedliche Anzahl an negativen Ergebnissen mit der unterschiedlichen Auswahl der Serovare zusammenhing, konnte ausgeschlossen werden. Dies war möglich, da von den 15 Serovaren, die auf dem LightCycler® 96 negative Ergebnisse lieferten, insgesamt neun Serovare (*Salmonella* Derby, *Salmonella* Glostrup, *Salmonella* Hadar, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Isangi, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Virchow und *Salmonella* Typhimurium) ebenfalls im Versuchsaufbau der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 Verwendung fanden. Diese zeigten dort ein positives Ergebnis. CR2 hingegen zeigte sich sowohl in den eigenen als auch in den Ergebnissen der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 hoch variabel mit einem vergleichbar großen Spektrum an Gruppen (37 Gruppen im Vergleich zu den 32 Gruppen aus der Publikation). Im Fall von CR2 konnte folglich festgestellt werden, dass für die angestrebte Serotypisierung diese Variabilität eher zu hoch war. Dies liegt darin begründet, dass zwar viele unterschiedliche Profile gemessen werden konnten, somit die Serovare jedoch auch in mehrere Gruppen eingeteilt werden mussten (beispielsweise sieben unterschiedliche Gruppen bei *Salmonella* Typhimurium). Daher konnten auch kaum mehr einheitlich geschlossene Serovargruppen definiert werden. Für eine Genotypisierung, welche das eigentliche Ziel der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 darstellte, war diese Variabilität hingegen ideal. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der beiden CRISPR-Zielgene zeigte eine Publikation anhand von *Clostridium difficile* (HARGREAVES et al., 2014). Dort wurde dargelegt, dass die geprüften Keime dieser Spezies

unterschiedliche CRISPR-Regionen aufweisen. Als Hauptgrund für diese Genveränderungen wurden Phagen genannt. Folglich könnten auch im Falle der Salmonellen gleiche Serovare unterschiedliche Ergebnisse bei diesen Zielgenen hervorbringen. Dies würde zum einen die hohe Varianz von CR2 erklären und in Verbindung mit der Abwandlung des PCR-Protokolls zu einer Touchdown-PCR auch die hohe Zahl negativer Ergebnisse bei CR1 begründen. Letzteres bedingt durch die aus der Touchdown-PCR resultierende erhöhte Spezifität, welche wiederum bei einer Veränderung im Bereich des Primeransatzes eine Anlagerung der Primer verhindert.

Auch für die dritte Zielengruppe, die VNTR-Zielgene mit den Zielgenen *yohM* und *shdA*, sind wiederkehrende Gensequenzen (Repeats) charakteristisch. Diese sind über das gesamte Genom verteilt und beinhalten eine charakteristische Anzahl dieser Repeats. VNTRs werden meist mit der Methode MLVA (Multi Locus VNTR Analyse) untersucht. In dieser werden die unterschiedlichen VNTR Loci amplifiziert und dann anhand der jeweiligen Größen (abhängig von der Anzahl an Repeats) bestimmt (FORTINI et al., 2007). Diese Zielgene verhielten sich in den eigenen Versuchen wie erwartet und zeigten keine Auffälligkeiten in Form von Überschneidungen der Produktgrößen oder der Schmelzpunkte. Ihre Varianz lag zwischen den „short targets“ und den CRISPR-Regionen.

Die Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendete für fast alle Primerpaare individuelle Thermoprofile. Dies galt nicht für die Paare A, I und K, welche mit einem gemeinsamen Thermoprofil verwendet werden konnten. Die Tatsache, dass also insgesamt fünf Thermoprofile verwendet werden mussten, verursachte eine sehr lange Zeitdauer bis für eine Probe Reaktionen mit allen sieben Primerpaaren durchgeführt worden waren. Insbesondere da einige Thermoprofile bis zu drei Stunden in Anspruch nahmen. Daher wurden die Ergebnisse des LightCycler® 96 auf die Möglichkeit geprüft, die Differenzierung der Serovare mit weniger Zielgenen bzw. weniger unterschiedlichen Thermoprofilen durchführen zu können. Hierbei schienen die Zielgene A, I und K interessant, da diese das gleiche Thermoprofil verwendeten. Obwohl diese Zielgene in ihrer Schmelzkurvenvarianz die niedrigsten Ergebnisse lieferten, konnten bei den hier dargestellten Ergebnissen alle verwendeten Serovare mit nur einem Lauf (Dauer ~ 1,5 Stunden) identifiziert werden. Wenn man die Ergebnisse in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 betrachtet, konnten dort hingegen nur sieben von 20 Serovaren mit den Zielgenen A, I und K bestimmt werden. Dies könnte einerseits durch eine andere Serovarauswahl oder durch die Unterschiede in Gerät und Farbstoff begründet sein.

Des Weiteren wurde zu Vergleichszwecken der Versuch nicht nur auf dem LightCycler® 96, sondern ebenfalls auf einem LightCycler® 480 durchgeführt. Allerdings zeigten die Ergebnisse der beiden LightCycler® Geräte Abweichungen. Zwar kann festgestellt werden, dass beide Geräte ähnliche Ergebnisse lieferten, dennoch wies der LightCycler® 480 eine breitere Varianz der Kurven auf. Dies bewirkte, dass einige Kurvengruppen, die im LightCycler® 96 noch eindeutig abgrenzbar waren, bei den Ergebnissen des LightCycler® 480 nicht mehr voneinander trennbar waren und somit als eine gemeinsame Gruppe gewertet werden mussten. Dies wirkte sich negativ auf die Diskriminierbarkeit der einzelnen Serovare aus, weshalb auf dem LightCycler® 480 keine Unterscheidung nur mit den Serovaren A, I und K möglich war. Hier müsste entweder ein weiterer Lauf mit dem Zielgen CR2 oder zwei Läufe mit den Zielgenen *yohM* und *shdA* zusätzlich durchgeführt werden. Erklärbar ist dieser Unterschied durch die verschiedenen Optiken der beiden Geräte. So besitzt der LightCycler® 96 eine Glasfaser-Optik, bei der je zwei Glasfaserkabel pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte verwendet werden. Von diesen beiden Kabeln ist eines für die Anregung des Farbstoffes zuständig während das andere die resultierende Floreszenz misst. Der LightCycler® 480 hat eine einzige optische Einheit, die die Fluoreszenz aller Vertiefungen der Platte gleichzeitig erfasst. Auch wenn beide Geräte Peltier-Elemente verwenden, sind zudem andere Effekte, wie unterschiedliche Elektronik, Steuerung und Software ebenfalls als Grund hierfür in Betracht zu ziehen. Die Erklärung eines gerätebezogenen Unterschieds wurde zudem durch eine Vielzahl von Publikationen beschrieben, die ebenfalls von solchen Unterschieden berichteten und dies auf unterschiedliche Faktoren, wie die genannten, zurückführten (SCHODER et al., 2005; HERRMANN et al., 2006; HERRMANN et al., 2007; STEPHENS et al., 2010).

Die Autoren der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 konnten bei ihren Untersuchungen *Salmonella* Hadar und *Salmonella* Glostrup nicht voneinander unterscheiden. Dies war mit den im eigenen Aufbau geprüften Stämmen nicht der Fall. Da für die hier durchgeführten Untersuchungen lediglich ein Isolat von *Salmonella* Glostrup zur Verfügung stand, wurde von Maksim Bratchikov DNS seiner *Salmonella*-Glostrup-Stämme zu Vergleichszwecken zur Verfügung gestellt. Diese Stämme wurden mit den vier *Salmonella*-Hadar-Proben und der *Salmonella*-Glostrup-Probe aus dem eigenen Aufbau überprüft. Zusätzlich wurde die bereits vorhandene *Salmonella*-Glostrup-Probe durch fünf weitere *Salmonella*-Glostrup-Stämme des BfRs ergänzt. Für den bereits vorhandenen *Salmonella*-Glostrup-Stamm wurde die Agglutination wiederholt, um das Serovar sicher zu bestätigen.

Die sechs deutschen *Salmonella*-Glostrup- und vier *Salmonella*-Hadar-Stämme wurden also zusammen mit der DNS der drei in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 verwendeten Proben geprüft. Die Stämme der Publikation verhielten sich dort ebenso wie die *Salmonella*-Hadar-Stämme, wohingegen alle sechs deutschen Isolate sich eindeutig von diesen abgrenzen ließen. Da die Autoren der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 die Serovar-Agglutination dieser Stämme nicht selbst durchgeführt hatten, wäre hier eine mögliche Erklärung eine fehlerhaft durchgeführten Agglutination, da beide Serovare im Kauffmann-White-Le Minor Schema ähnlich eingeteilt werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass es sich auch bei den in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 untersuchten Proben eigentlich um *Salmonella* Hadar handelte. Da keine lebenden Stämme zugesandt werden konnten, besteht keine Möglichkeit dies durch eine eigene Serovar-Agglutination nachzuprüfen. Relativ sicher ist, dass es sich bei allen drei Proben um den gleichen Stamm handeln muss, da nach einer persönlichen Mitteilung von Maksim Bratchikov alle drei Isolate aus dem gleichen Ausbruch stammten.

Zuletzt muss noch erwähnt werden, dass in beiden Versuchen unterschiedliche PCR-Instrumente verwendet wurden. Dies waren zum einen der Rotor-Gene 6000 in der Publikation von Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 sowie die LightCycler® 96 und 480, die für die eigenen Untersuchungen verwendet wurden. Diese Geräte unterscheiden sich grundlegend in ihrem jeweiligen Aufbau. Während die LightCycler®-Geräte Peltier-Thermoblöcke verwenden, besitzt der Rotor-Gene einen Karussell-basierten Aufbau mit Luftheizung. Dieser unterschiedliche Aufbau und der damit verbundene Unterschied in der Funktionsweise sowie die unterschiedliche Software, kann, neben den im eigenen Aufbau durchgeführten Veränderungen, eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Gruppeneinteilungen darstellen. Auch hier muss auf verschiedene Publikationen verwiesen werden, die selbst bei gleichartig aufgebauten Geräten Unterschiede in den Ergebnissen aufzeigten (SCHODER et al., 2005; HERRMANN et al., 2006; HERRMANN et al., 2007; STEPHENS et al., 2010).

Des Weiteren konnte erfolgreich die Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Isolate in die Antigenformeln (1,4,[5],12:i:1,2) und (1,4,[5],12:i:-) durchgeführt werden. Dies wurde durch Etablierung des Primerpaares FljB-1,2/1,5 aus der PCR II-G3 (RAJTAK et al., 2011) in einer HRM-Analyse erreicht. Dieses Primerpaar zielt exakt auf das der monophasischen Variante (1,4,[5],12:i:-) fehlende Zielgen *fljB* ab. Alle geprüften Isolate der *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) lieferten keine Amplifikate und konnten

so sehr leicht differenziert werden.

Zudem fanden Untersuchungen auch für die Differenzierung der *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2) statt. Hier konnte jedoch kein vollends zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Es wurde zwar der Großteil der O5-negativen Isolate richtig detektiert, allerdings zeigten zwei Proben (Probe 3 *Salmonella* Typhimurium (1,4,12:i:-) und Probe 6 *Salmonella* Typhimurium (1,4,12:i:1,2)) nicht die erwünschten Reaktionen für die jeweiligen Primerkombinationen. Dies konnte im Fall von Probe 6 noch mit einer mangelnden Eignung des Forward-Primers 1 bzw. 5 erklärt werden. Dieser wurde bei beiden Varianten verwendet und wurde genau auf den Mutationslocus platziert. Scheinbar konnte sich der Primer dessen ungeachtet anheften und lieferte daher ein normales Produkt. Die Probe 6 konnte aber dennoch durch die korrekte Reaktion mit der Primerkombination 2 differenziert werden. Schwerer wog die fehlerhafte Reaktion der Probe 3, da für diese keine Erklärung möglich war. Auch eine Wiederholung der Reaktion zeigte das gleiche Ergebnis. Im Falle einer gewünschten Differenzierung der O5-negativ Variante muss abschließend festgehalten werden, dass diese ausgesprochen schwierig, wenn nicht gar unmöglich erscheint. Dies liegt vor allem darin begründet, dass der Verlust des O5-Antigens nicht durch die Mutation eines einzelnen Locus, vermutlich nicht einmal eines einzelnen Genes verursacht wird (HAUSER et al., 2011). Außerdem ist die Auswahl von geeigneten Primern aufgrund der Sequenz deutlich erschwert. So ist der Gesamt-GC-Gehalt mit 38,5 % (berechnet für *Salmonella*-Typhimurium-14028S) relativ niedrig. Dies und der Umstand, dass sich im *oafA*-Gen extrem viele Basenwiederholungen, bis zu fünf Stück, vor allem von A und T befinden, erschweren erheblich das Primer-Design.

Es muss hier allerdings ebenfalls betont werden, dass die Differenzierung der Varianten monophasisch (1,4,[5],12:i:-) und O5-negativ (1,4,12:i:1,2) keinesfalls notwendig ist. In den gesetzlichen Grundlagen, wie die Geflügel-Salmonellen-Verordnung und alle relevanten EU-Verordnungen für Bekämpfung von Salmonellen beim Geflügel, gelten alle Varianten als *Salmonella* Typhimurium und werden gleich behandelt. Alle anderen Verordnungen, wie die Rinder-Salmonellose-Verordnung, die Verordnung für Anzeigepflichtige Tierseuchen oder die Verordnungen für Meldepflichtige Tierkrankheiten, erfassen ohnehin alle Salmonellen-Serovare. Die Differenzierung dieser *Salmonella*-Typhimurium-Varianten ist folglich als eine Erweiterung des Differenzierungsspektrums zu sehen.

Auch im Vergleich zu anderen Differenzierungsmethoden zeigt der eigene Versuchsaufbau eine gute Eignung für die Serovar-Differenzierung. Hier muss zunächst festgehalten werden, dass viele Publikationen und die damit entwickelten Methoden nur der genaueren Analyse

eines einzelnen Serovars gewidmet sind. Beispiele hierfür sind die MLVA- und PFGE-Analysen beschrieben in zwei Publikationen (BOXRUD et al., 2007; TORPDAHL et al., 2007). Solche Methoden dienen meist für die Ermittlung von Ausbrüchen und Infektketten (TORPDAHL et al., 2007). Den Ansatz einer molekularbiologischen Serovar-Differenzierung beschreiben deutlich weniger Autoren. Ferner muss festgestellt werden, dass die Methoden nur mit einer begrenzten Auswahl, meist die am häufigsten vorkommenden oder für das jeweilige Feld am wichtigsten erscheinenden Serovare, geprüft werden können. Beispiele hierfür sind die mit 14 Serovaren durchgeführte Microarray-Differenzierung nach Scaria et al. aus dem Jahr 2008 oder die MLST-Analyse nach Tankouo-Sandjong et al. aus dem Jahr 2007, für die eine Auswahl von 22 Serovaren getroffen wurde. Das Spektrum der insgesamt 2659 Serovare (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014) ist einfach zu groß für eine Überprüfung gegen alle Serovare. Folglich kann bei keiner der publizierten Methoden ausgeschlossen werden, dass weitere Serovare ebenfalls differenziert werden können, beziehungsweise, dass weitere Serovare sich ebenso wie bereits definierte Serovare verhalten.

Vergleicht man die HRM-Analyse mit anderen alternativen Serotypisierungsmethoden wie PFGE, MLVA, MLST, Microarray oder den verschiedenen Möglichkeiten der PCR (real-time oder konventionell, singleplex oder multiplex) in Bezug auf den apparativen, zeitlichen und finanziellen Aufwand, lassen sich folgende Schlüsse ziehen. In allen drei Kategorien zeigen sich Methoden, die eine nachträgliche Analyse anhand der Gelelektrophorese benötigen (PFGE, MLVA und konventionelle PCRs) deutlich im Nachteil. Dies liegt darin begründet, dass diese ein weiteres Gerät, mehr Zeit und mehr Material benötigen. In Bezug auf die benötigte Zeit und Kosten ist hingegen besonders die MLST als kritisch zu sehen, da hier noch eine teure und langwierige Sequenzierung erfolgen muss (ZEINZINGER et al., 2012). Dennoch können mit der MLST ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden. So wurden die 74 in der Publikation von Tankouo-Sandjong et al. aus dem Jahr 2007 geprüften Proben (verteilt auf 22 Serovare) gut unterschieden. Auch die in der Publikation von Scaria et al. aus dem Jahr 2008 dargelegte Differenzierungsmethode mit Hilfe eines Microarrays erfordert einen erheblich höheren apparativen, zeitlichen und finanziellen Aufwand. Dies ist dadurch bedingt, dass die in der Analyse verwendeten Slides zunächst in einem aufwendigen Prozess mit den entsprechenden Sonden belegt werden müssen. Hierfür wird sowohl ein Gerät, als auch Verbrauchsmaterialien benötigt. Diesem folgt ein weiterer zeitaufwendiger Schritt, die Hybridisierung. In dieser wird die DNS hinzugegeben und der ganze Ansatz über Nacht inkubiert. Hiernach kann nun die Auswertung erfolgen, welche, ob der Komplexität des Ergebnisses, oft ebenfalls ein hohes Maß an Zeit in Anspruch nehmen kann. Die Publikation

von Scaria et al. aus dem Jahr 2008 zeigte, dass die 44 geprüften Proben den 14 Serovaren zugeordnet werden konnten. Da im Microarray sehr viele Gene untersucht werden, entstand hier bei einigen Serovaren (*Salmonella* Typhimurium mit *Salmonella* Saintpaul sowie *Salmonella* Enteritidis mit *Salmonella* Dublin) die Situation, dass sich diese in Genen gleichen, die nicht für die konventionelle Serotypisierung des Kaufmann-White Le Minor Schemas verwendet werden. Somit erfolgte die Eingruppierung nicht anhand des eigentlichen Serovars, sondern eher nach dem jeweiligen Genovar. Ein großer Vorteil der Methode im Allgemeinen ist jedoch die Vielzahl an weiteren erlangten genetischen Informationen, wie beispielsweise über Virulenzeigenschaften. Daher erscheint die Methode im Vergleich zu einer HRM-Analyse in Bezug auf eine reine Serovardifferenzierung als zu komplex. Für Ansätze, die über diese hinausgehen sollen, wäre sie jedoch geeignet. Eine Methode, die der HRM-Analyse hinsichtlich der Zeit und Kosten gleichzusetzen ist, ist die real-time SYBR-Green PCR, wie beispielsweise in den eigenen Ergebnissen beziehungsweise in der Publikation von Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 vorgestellt. Dies liegt darin begründet, dass die real-time PCR ähnliche Verbrauchsmaterialien benötigt und ebenfalls das Ergebnis sofort nach Beendigung des Laufs angezeigt wird. Diese ist sogar hinsichtlich des apparativen Aufwands im Vorteil, da die entsprechenden Geräte in den meisten Laboren vorhanden sind und im Vergleich zu den HRM-fähigen Geräten billiger sind. Wie jedoch in dieser Arbeit dargelegt wurde, bietet die PCR selbst in der dargelegten Form aus drei Multiplex-PCRs nicht genügend Differenzierungspotential, um zumindest die geprüfte Auswahl zu unterscheiden.

Vergleicht man die HRM-Analyse mit der serologischen Differenzierung, so lassen sich folgende Schlüsse ziehen: Die Kosten für die Reaktionen selbst belaufen sich in etwa im selben Rahmen, da die HRM-Analyse zwar den Mastermix und das Extraktionskit benötigt, im Gegensatz bedarf die serologische Differenzierung allerdings der teuren Agglutinationsseren. Allerdings benötigt die HRM-Analyse ein teures, HRM-fähiges Gerät. Im Bezug auf den apparativen Aufwand ist dem entsprechend die serologische Differenzierung im Vorteil, da hier, außer einem Brutschrank, keine speziellen Geräte benötigt werden. Dies wird jedoch bei einem Vergleich des Zeitfaktors aufgewogen, da hier die HRM-Analyse deutlich schneller zu einem Ergebnis kommen kann.

Fazit:

Es lässt sich also abschließend feststellen, dass das dargestellte High Resolution Melting auf dem LightCycler® 96 für die Differenzierung der am häufigsten in unserem Labor vorkommenden Erreger gut geeignet ist. Dies hat infektionsepidemiologische Relevanz, da

durch die Differenzierung mittels High Resolution Melting eine erhebliche Zeitersparnis gegenüber der klassischen Methode der Serovar-Agglutination erzielt werden kann. Bei dieser muss in jedem Fall ein Zeitraum von mehreren Tagen eingeplant werden bis ein sicheres Differenzierungsergebnis ausgesprochen werden kann. Der Lauf der dargestellten HRM hingegen benötigt lediglich 1,5 Stunden sowie etwas Zeit für die Extraktion und Auswertung des Ergebnisses. Somit könnten die zuständigen Ämter bedeutend früher notwendige Schritte einleiten. Da jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass es *Salmonella* Glostrup Isolate gibt, die sich tatsächlich wie *Salmonella* Hadar in der HRM-Analyse verhalten, müsste bei Detektion eines dieser Isolate eine klassische Serovar-Differenzierung zur Sicherung der Diagnose angeschlossen werden. Es gibt außerdem eine Vielzahl weiterer Serovare, die nicht in dieser Untersuchung geprüft werden konnten, daher müsste vor einer Anwendung in der Routinediagnostik diese molekularbiologische Methode über einen längeren Zeitraum parallel zur klassischen Serovar-Differenzierung angewandt werden, was allerdings für diesen Zeitraum einen Nachteil im Bezug auf die Kosten nach sich ziehen würde. Allerdings sind bei den hier durchgeführten Untersuchungen bereits die häufigsten im Hause gefunden veterinärmedizinischen Serovare mit sehr gutem Erfolg geprüft worden, so dass diese HRM-Analyse voraussichtlich eine sehr gute Alternative zur Unterscheidung mittels Kauffmann-White-Le Minor Schema darstellt.

3 Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung

Ziel war es, eine genetische Grundlage phänotypischer Differenzierungsmerkmale (LAH-Impfstämme: Resistenzen, IDT-Impfstämme: Auxotrophien) der vier in Deutschland zugelassenen Lebend-Impfstämme für *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis besonders in Bezug auf den Geflügelbereich zu finden. Anhand dieser genetischen Grundlagen sollte eine molekularbiologische Differenzierungsmethode mit Hilfe der HRM-Analyse entwickelt werden. Dies würde abermals den Vorteil einer Zeitersparnis mit sich bringen. Bisher erfolgt die Differenzierung anhand der phänotypischen Marker, wozu aber eine Inkubation von 18-24 Stunden (LAH-Impfstämme) oder sogar 18-48 Stunden (IDT-Impfstämme) notwendig ist. Da es tierseuchenrechtlich jedoch bei Huhn und Pute von großer Bedeutung ist, ob es sich um einen Impf- oder Feldstamm handelt, ist eine schnellere Differenzierung wünschenswert.

Ähnliche Differenzierungsmethoden wurden bereits publiziert, jedoch nicht für *Salmonella*-Enteritidis- oder *Salmonella*-Typhimurium-Impfstämme (KANG et al., 2012; SHAHID et al., 2014). So wurde eine konventionelle Tripleplex-PCR für die Differenzierung eines

Salmonella-Gallinarum-Lebendimpfstammes entwickelt. Bei dieser wurde der Impfstamm auf Punktmutationen hin untersucht und diesen Mutationen entsprechend ein Primerpaar für die Differenzierung gewählt. Hierbei handelte es sich jedoch um eine konventionelle PCR. Somit mussten die Produkte nach der PCR noch mittels Gelelektrophorese dargestellt werden (KANG et al., 2012). Da dies einen zusätzlichen apparativen, zeitlichen und finanziellen Aufwand darstellt, ist eine Methode mit sofortigem Ergebnis nach der PCR wünschenswert. Eine Möglichkeit hierfür bietet eine Unterscheidung mittels HRM-Analyse. Dass diese eine geeignete Methode zur Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung darstellt, wurde für den Temperatur-sensitiven Impfstamm und die nicht-Temperatur-sensitiven Feldstämme von *Mycoplasma synoviae* gezeigt. Auch hier erfolgte die Differenzierung anhand spezifischer Punktmutationen (SHAHID et al., 2014). Diesen Beispielen entsprechend sollten für die eigene Differenzierung ebenfalls charakteristische Mutationen durch Sequenzierung erkannt und in der HRM-Analyse detektiert werden.

Sequenzierung des *rpoB*-Gens bei den LAH-Impfstämmen (*Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis):

Beide LAH-Impfstämme zeigen eine Resistenz gegenüber Rifampicin. Der *Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm besitzt außerdem eine Resistenz gegenüber Nalidixinsäure, der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm hingegen eine Resistenz gegenüber Streptomycin. Im Falle der LAH-Stämme schienen folglich die Rifampicin-Resistenz und das damit verbundene *rpoB*-Gen die am besten geeignete Wahl für eine erfolgreiche, gemeinsame Differenzierung zu sein.

Durch Sequenzierung des *rpoB*-Gens konnte bei beiden Impfstämmen eine Punktmutation entdeckt werden, welche jeweils den Austausch einer Aminosäure im kodierten Protein zur Folge hatte. Bei diesen Veränderungen handelte es sich zum einen um einen Austausch von Histidin an der Stelle 526 (His⁵²⁶) zu Aspariginsäure sowie von Serin an der Stelle 531 (Ser⁵³¹) zu Phenylalanin.

Dass Veränderungen an eben jenen Stellen zur Rifampicin-Resistenz führen, wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben (OVCHINNIKOV et al., 1981a; 1981b; 1983; LISITSYN et al., 1984). So konnten Ovchinnikov und Lisitsyn bei den von ihnen untersuchten *Escherichia coli*-Stämmen lediglich vier Positionen entdecken, an denen eine Mutation die Rifampicin-Resistenz bewirken konnte. Diese Beobachtung wurde durch die Publikation von Jin und Gross aus dem Jahr 1988 durch Beobachtungen bei *Escherichia coli*

gestützt. Diese fanden zwar an weiteren zehn Positionen Mutationen, stellten jedoch ebenfalls fest, dass sich die Mutationen an einer begrenzten Anzahl von Punkten häuften. Dem entsprechend nahmen sie ebenfalls an, dass die Orte, an denen eine Rifampicin-Resistenz durch Mutation des *rpoB*-Gens hervorgerufen werden können, begrenzt sind. Die eigenen Ergebnisse entsprachen exakt diesen Beobachtungen, da auch die beiden gefundenen Mutationen an den Stellen 526 und 531 des *rpoB*-Gens zu den vier (OVCHINNIKOV et al., 1981a; 1981b; 1983; LISITSYN et al., 1984) beziehungsweise 14 (JIN & GROSS, 1988) beschriebenen Mutationsorten zählten.

Eine Erklärung für den Wirkungsmechanismus der Resistenz lieferte vor allem die Publikation von Ovchinnikov et al. aus dem Jahr 1983. Diese stützte sich hierbei auf Beobachtungen verschiedener anderer Publikationen (KESSLER & HARTMANN, 1977; MCCLURE & CECH, 1978; CHERTOV et al., 1983). Diese beschrieben, dass Rifampicin in seiner Funktion als Antibiotikum vermutlich ein RNA Produkt nachahmt, welches an die durch das *rpoB*-Gen kodierte β -Untereinheit der RNA-Polymerase andockt. Es wurde daher vermutet, dass der Bereich des Mutationsclusters entweder jenen Teil der β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert, an den das Rifampicin andockt, und somit die direkte Verbindung der beiden Stoffe verhindert. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch eine Konformitätsänderung des Proteins an anderer Stelle der Ort der Verbindung überlagert wird und somit die Verbindung der beiden Parteien indirekt verhindert (OVCHINNIKOV et al., 1983).

HRM-Analyse der LAH-Impfstämme:

Hier konnte der *Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm deutlich besser von den übrigen Stämmen unterschieden werden als der *Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm. Dies kann durch die unterschiedlichen SNP-Klassen erklärt werden. Hierbei werden die möglichen Basenänderungen in 4 Klassen (1: C/T und G/A, 2: C/A und G/T, 3: C/G, sowie 4: A/T) eingeteilt (LIEW et al., 2004; KRENKOVA et al., 2009). Dabei gilt, dass von einem SNP der Klasse 1 die größte Schmelzkurvenverschiebung zu erwarten ist und entsprechend von denen der Klasse 4 die niedrigste. Diesem Ansatz folgten die Ergebnisse, da es sich bei *Salmonella* Enteritidis um einen Austausch von C gegen T und somit einem SNP der Klasse 1 (Schmelzkurvenverschiebung $> 0,5$ °C) und im Falle von *Salmonella* Typhimurium mit dem Austausch von C gegen G um einen SNP der Klasse 3 (Schmelzkurvenverschiebung $< 0,2$ °C) handelte. Dieser konnte im gewählten Ansatz dennoch gut von den übrigen verwendeten Proben unterschieden werden. Somit war es möglich anhand der gefundenen Mutationen

beide LAH-Impfstämme im gleichen Ansatz zu identifizieren und zu differenzieren.

Sequenzierung der *purA*- und *purB*-Gene bei den IDT-Impfstämmen (*Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis):

Die IDT-Impfstämme besitzen als phänotypischen Marker eine Histidin- und Adenin-Auxotrophie. Dies bedeutet, dass die beiden Stoffe von den Bakterien nicht selbst hergestellt werden können und somit von diesen extern aufgenommen werden müssen. Folglich wurde nach möglichen genetischen Grundlagen für die Histidin- und Adenin-Auxotrophie gesucht.

Für die Adenin-Auxotrophie schienen die Gene *purA* und *purB* passend, da diese die Enzyme Adenylsuccinatsynthetase und Adenylsuccinatlyase kodieren, welche in den letzten beiden Schritten der Adeninsynthese benötigt werden. Diese letzten beiden Schritte scheinen insofern richtig, da das durch die vorangegangenen Schritte synthetisierte Inosinmonophosphat (IMP) ebenfalls für Guaninsynthese verwendet wird (VOET & VOET, 2011). Da für Guanin jedoch keine Auxotrophie beschrieben ist, müsste die Mutation folglich in einem der beiden letzten Schritte, die ausschließlich Adenin synthetisieren, zu finden sein. Hinzu kommt, dass auch andere Publikationen diese beiden Gene als möglichen Sitz einer Adenin-Auxotrophie beschreiben (MORMANN et al., 2006). Daher wurden die Gene *purA* und *purB* mittels Sequenzierung überprüft. Es konnte allerdings keine Veränderung festgestellt werden. Es muss folglich noch einen weiteren Punkt geben, an dem die Adeninsynthese durch Mutation entscheidend unterbunden werden kann. Dieser konnte allerdings aufgrund der Komplexität im Rahmen dieses Projektes nicht erörtert werden und die Adenin-Auxotrophie wurde somit nicht weiter verfolgt.

Sequenzierung des *his*-Genkomplexes bei den IDT-Impfstämmen:

Eindeutiger stellte sich die Situation für die Histidin-Auxotrophie dar, da es sich bei der Histidinsynthese um einen hoch konservierten und bei vielen Organismen identischen Mechanismus handelt (KULIS-HORN et al., 2014). So zeigte die Publikation von Juliao et al. aus dem Jahr 2007 am Beispiel von *Haemophilus influenzae*, dass sich alle für die Histidinsynthese nötigen Enzyme an einem gemeinsamen Ort auf dem DNS-Strang befinden. Diese Situation konnte nach einem Vergleich mit in der Gendatenbank hinterlegten *Salmonella*-Sequenzen auch für *Salmonella* bestätigt werden. Des Weiteren ist für die Histidinsynthese belegt, dass diese aus einer Kette von Reaktionen besteht. Wird diese Abfolge an einem Punkt unterbrochen, so kann kein Histidin synthetisiert werden (ALIFANO

et al., 1996; FANI et al., 2007).

Die durchgeführten Sequenzierungen des *his*-Genkomplexes zeigten einige Punktmutationen auf, welche im Folgenden kurz einzeln betrachtet werden. Im Falle des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes, wurde lediglich eine Punktmutation (C/T) im Bereich von *hisH* entdeckt. Diese bewirkt allerdings eine massive Veränderung des betreffenden Enzyms, da die Mutation den vorzeitigen Abbruch der ordnungsgemäßen Synthese verursacht. Durch das entstandene Stopcodon kann hier nur $\sim 1/3$ des Enzyms synthetisiert werden. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, der IGP-Synthetase (ALIFANO et al., 1996; FANI et al., 2007). Dieses Enzym setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, von denen eine durch *hisH* kodiert wird, die andere durch *hisF*. Die IGP-Synthetase katalysiert den 5. Schritt in der Kette der Histidinsynthese, die Umwandlung von N¹-5'-Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonucleotid zu Imidazol-glycerinphosphat. Da, wie beschrieben, lediglich $\sim 1/3$ des *hisH*-Enzyms beim IDT-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm exprimiert werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Untereinheit der IGP-Synthetase nicht funktionsfähig ist. Somit kann der oben genannte Umwandlungsschritt nicht durchgeführt werden und die Histidin-Auxotrophie des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes kann damit erklärt werden.

Bei der Auswertung der Sequenzierung des IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstammes wurden insgesamt drei Punktmutationen verteilt auf die Abschnitte *hisG* (C zu T), *hisC* (G zu A) sowie *hisB* (G zu A) entdeckt. Von diesen verursachte jedoch lediglich die Mutation in *hisB* eine Veränderung der Aminosäuresequenz. Die beiden anderen kodierten trotz Mutation an der betreffenden Stelle die gleiche Aminosäure. Es wurde beschrieben, dass *hisB* ein bifunktionales Enzym, welches an zwei Stellen der Kette ansetzt, kodiert (ALIFANO et al., 1996; FANI et al., 2007). Bei diesen Stellen handelt es sich zum einen um Schritt 6, der die Umwandlung von Imidazolglycerinphosphat zu Imidazolacetolphosphat beinhaltet, sowie Schritt 8, bei dem L-Histidinolphosphat aus Imidazolacetolphosphat gebildet wird. Es muss aber festgehalten werden, dass die Veränderungen durch die Mutation hier nicht so deutlich sind wie im Falle des *Salmonella*-Typhimurium-Impfstammes. Hier wird lediglich Glycin (GGA) zu Arginin (AGA) ausgetauscht, das restliche Enzym kann normal gebildet werden. Dennoch verursacht die Mutation sowohl eine Veränderung des pH-Wertes von neutral zu basisch, als auch eine Veränderung der Polarität von unpolar zu polar der kodierten Aminosäure. Obwohl bei den in der Publikation von Juliao et al. aus dem Jahr 2007 beschriebenen Histidin-auxotrophen *Haemophilus influenzae* Keimen der komplette *his*-Genkomplex nicht nachgewiesen werden konnte, muss angenommen werden, dass auch die

für den IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm gefundenen, kleinen Veränderungen ausreichen, um die Tätigkeit in einem oder gar in beiden Schritten, in denen das Enzym benötigt wird, zu verhindern und somit zu einer Histidin-Auxotrophie führen.

HRM-Analyse der IDT-Impfstämme:

Bei beiden für die HRM-Analyse der IDT-Impfstoffe gewählten Mutationen handelte es sich um SNPs der Klasse 1 (LIEW et al., 2004; KRENKOVA et al., 2009). Diese sind in der Regel einfach zu detektieren, da sie die größtmögliche Schmelzkurvenverschiebung zeigen. Diese Annahme wird durch die HRM-Ergebnisse bestätigt, in denen die beiden Impfstämme eindeutig von den jeweiligen Feldstämmen sowie den beiden LAH-Impfstämmen, unterschieden werden konnten. Ein Nachteil bleibt, da dies nicht mit einem einzigen Primerpaar erfolgen konnte, da beide Mutationen zu weit voneinander entfernt lagen. Dies wurde jedoch dadurch aufgewogen, dass beide Primerpaare mit dem gleichen Thermoprofil verwendet werden konnten, weshalb die Differenzierung beider Impfstämme dennoch innerhalb eines einzelnen Laufes erfolgen konnte.

Fazit für die Differenzierung aller vier Impfstämme auf dem LightCycler® 96:

Es konnten mit der beschriebenen Methode alle derzeit in Deutschland zugelassenen *Salmonella*-Enteritidis- und *Salmonella*-Typhimurium-Lebendimpfstoffe von den jeweiligen Feldstämmen differenziert werden. Dies ist, aufgrund der gesetzlichen Lage, besonders bei Proben die vom Geflügel stammen von Belang. Außerdem kann, da die Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung das gleiche Thermoprofil wie Zielgene A, I und K der Serovar-Differenzierung verwendet, die Impfstamm/Feldstamm-Unterscheidung gleichzeitig mit der Serovar-Differenzierung durchgeführt werden.

Gerätevergleich für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung:

Der Vergleich sollte die Möglichkeit überprüfen, ob die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung neben dem LightCycler® 96 auch auf anderen Geräten, wie dem LightCycler® 480 und dem Rotor-Gene Q, durchzuführen ist. Dies ist zum einen für andere Anwender von Interesse, da eine Vielzahl unterschiedlicher Cycler erhältlich sind, zum anderen liefert es eine höhere Flexibilität im Falle eines Defektes des eigenen Gerätes. Entsprechend dem in der Publikation von Ugo et al. aus dem Jahr 2010 dargelegten Prinzip, dass Farbstoff und Gerät von identischen Firmen durch die mehrfache gemeinsame Prüfung im Laufe des Entwicklungsprozesses am besten aufeinander abgestimmt sind, wurde hier für

den LightCycler® 480 abermals der LightCycler® 480 High Resolution Melting Master und für den Rotor-Gene Q das Type-it Kit verwendet.

Hier zeigte sich, dass der LightCycler® 96 und der Rotor-Gene Q vergleichbare Ergebnisse lieferten. Beide Geräte konnten alle vier Impfstämme differenzieren. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf dem LAH-*Salmonella*-Typhimurium-Impfstamm, welcher als einziger einen SNP der Kategorie 3 enthielt und somit bedeutend schwieriger zu differenzieren war als die übrigen SNPs der Kategorie 1. Beide Geräte konnten diesen aber eindeutig von den übrigen Proben abgrenzen. Für den LightCycler® 480 war dies nicht der Fall. Hier konnten lediglich die Kategorie 1 SNPs detektiert werden, der Kategorie 3 SNP wurde durch die übrigen Proben überlagert. SNPs der Kategorie 3 bewirken lediglich eine Schmelzkurvenverschiebung von weniger als 0,2 °C, wogegen SNPs der Kategorie 1 mindestens eine Verschiebung von 0,5 °C nachsichziehen (LIEW et al., 2004; KRENKOVA et al., 2009). Daher kann angenommen werden, dass die geringere Schmelzkurvenverschiebung durch den LightCycler® 480 nicht mehr detektiert werden konnte. Dies kann durch eine insgesamt größere Varianz der Schmelzkurven des LightCycler® 480 begründet werden, welche bereits beim High Resolution Melting nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 zu erkennen war. Dies wiederum könnte auf die Optik des LightCycler® 480 zurückzuführen sein, da dieser mit einer einzigen Optik die Fluoreszenz aller Vertiefungen der Platte gleichzeitig erfasst. Dem steht die Glasfaser-Optik des LightCycler® 96 entgegen, bei dem für jede Vertiefung zwei separate Glasfaserkabel verwendet werden bzw. der karussellbasierte Aufbau des Rotor-Gene Q, bei dem die Proben an der Optik vorbei rotieren. Ein weiterer Unterschied der Geräte besteht darin, dass die LightCycler® Geräte einen peltierbasierten Thermalblock besitzen, wohingegen ein derartiger Thermalblock für den Rotor-Gene Q komplett entfällt. Hier befinden sich die Proben „frei“ in der beheizten Kammer, gehalten werden sie durch einen Hartplastikeinsatz am oberen Ende des Reaktionsgefäßes. Da sich die Ergebnisse LightCycler® 96 und des Rotor-Gene Q aber weitestgehend gleichen, ist dies offensichtlich nicht für den Unterschied zu den Ergebnissen des LightCycler® 480 verantwortlich. Hier verursachen vermutlich unterschiedliche Elektronik, Steuerung und Software die divergierenden Ergebnisse. Unterstützt wird die Möglichkeit eines gerätebedingten Unterschieds auch durch verschiedene Publikationen die ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse des gleichen Experiments auf verschiedenen Geräten beschrieben (SCHODER et al., 2005; STEPHENS et al., 2010). Besonders interessant ist hierbei die Tatsache, dass in der Publikation von Schoder et al. aus dem Jahr 2005 nur peltierbasierte Cycler geprüft wurden. Diese Geräte verwendeten folglich alle das gleiche

Temperatur-Regulations-Element. Dennoch konnte in der Publikation aufgezeigt werden, dass die Unterschiede der Geräte hauptsächlich durch Abweichungen in der Temperaturregulation entstanden waren. Dies bekräftigt die Möglichkeit eines gerätebezogenen Unterschieds bei den peltierbasierten Geräten LightCycler® 96 und LightCycler® 480.

Folglich können der LightCycler® 96 und Rotor-Gene Q für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung empfohlen werden, der LightCycler® 480 hingegen unter den dargelegten Bedingungen nicht. Bei Verwendung anderer HRM geeigneter Geräte müssen diese unbedingt auf ihre Sensitivität anhand von Positiv- und Negativ-Kontrollen geprüft werden. Allerdings ist bei entsprechender Sensitivität der Optik zu erwarten, dass der Nachweis problemlos übernommen werden kann.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die zeit- und kostenintensive Salmonellen-Serotypisierung mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu komplettieren und nach Möglichkeit zu ersetzen. Es war geplant, verschiedene publizierte, molekularbiologische Nachweise zu prüfen und gegebenenfalls zu erweitern. Hierfür wurde ein Aufbau dreier Multiplex-PCRs (RAJTAK et al., 2011) und ein High Resolution Melting (HRM) (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011) etabliert und anschließend evaluiert.

Zudem sollte im Rahmen dieses Projektes eine molekularbiologische Methode zur Unterscheidung von lebenden Impf- und Feldstämmen der Serovare *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium entwickelt werden. Deshalb war geplant, die genetischen Grundlagen der phänotypischen Marker zu ergründen und anhand dieser ebenfalls ein High Resolution Melting für die Differenzierung der Impf- und Feldstämme zu entwickeln.

Für die *Salmonella*-Serovar-Differenzierung mittels Multiplex-PCRs (RAJTAK et al., 2011) wurden 210 Stämme verteilt auf 31 Serovare geprüft. Es konnten hier jedoch nur wenige Serovare eindeutig differenziert werden (*Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-), *Salmonella* Subspezies IIIb, *Salmonella* Enteritidis sowie der IDT-*Salmonella*-Enteritidis-Impfstamm). Für die übrigen Serovare konnte in Verbindung mit der Gelelektrophorese nur eine grobe Einteilung in insgesamt zehn Gruppen erreicht werden. Diese Gruppen enthielten bis zu zehn Serovare. Zudem konnten sehr wichtige Serovare wie *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium nicht endgültig differenziert werden. Für spezielle Fragestellungen, wie die Differenzierung der eindeutig unterscheidbaren Serovare, könnten diese Ergebnisse dennoch nützlich sein.

Das High Resolution Melting nach Bratchikov und Mauricas aus dem Jahr 2011 wurde mit guten Ergebnissen evaluiert. Es konnten alle geprüften 100 Proben (zusammengesetzt aus 21 Serovaren) innerhalb eines Laufes mit dem LightCycler® 96 differenziert werden. Für eine zusätzliche Verbesserung dieser Methode, in Form einer genaueren Differenzierung des Serovars *Salmonella* Typhimurium, sollte das Protokoll um Differenzierungsmöglichkeiten für die *Salmonella*-Typhimurium-Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2) und die *Salmonella*-Typhimurium-Variante monophasisch (1,4,[5],12:i:-) erweitert werden. Dies gelang gänzlich für die monophasische Variante (1,4,[5],12:i:-) durch eine Erweiterung der HRM-Analyse mit dem Primerpaar FljB 1,2;1,5 nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 sowie teilweise für die

Variante O5-negativ (1,4,12:i:1,2). In den gesetzlichen Grundlagen, wie der Geflügel-Salmonellen-Verordnung und allen relevanten EU-Verordnungen für Bekämpfung von Salmonellen beim Geflügel, werden alle Varianten als *Salmonella* Typhimurium klassifiziert und deshalb gleich behandelt. Alle anderen Verordnungen, wie die Rinder-Salmonellose-Verordnung oder die Verordnung für Meldepflichtige Tierkrankheiten, erfassen ohnehin alle Salmonellen-Serovare. Somit ist eine weitere Unterscheidung der Serovare nicht notwendig, bietet aber Möglichkeiten für eine tiefgründigere Diagnostik, falls diese gewünscht ist. Auch ein Nachteil gegenüber der serologischen Differenzierung stellt sich durch die nur teilweise Differenzierungsmöglichkeit der Variante O5-negativ somit nicht. Um die Anwendbarkeit der HRM-Analyse in der Routinediagnostik, insbesondere bei auftreten neuer Serovare, besser beurteilen zu können, muss diese molekularbiologische Methode jedoch zunächst über einen längeren Zeitraum parallel zur klassischen Diagnostik angewandt werden, bevor sie in der Routinediagnostik verwendet werden kann. Mit Hilfe dieser Methode könnte allerdings, bei in etwa gleichem finanziellem Aufwand, ein erheblicher Zeitgewinn bei der Salmonellen-Differenzierung erzielt werden. Voraussetzung hierfür wäre jedoch das Vorhandensein eines HRM-fähigen Gerätes.

Die Entwicklung einer molekularbiologischen Methode für die Impfstamm/Feldstamm-Differenzierung konnte ebenfalls mit sehr gutem Ergebnis durchgeführt werden. Es konnten mehrere Punktmutationen, sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs), auf verschiedenen Genen (*rpoB* und *his*) mittels Sequenzierung entdeckt werden. Anschließend wurden HRM-Tests entwickelt, die die SNPs aller vier zugelassenen *Salmonella*-Lebendimpfstämme eindeutig differenzieren können. Diese Methode wurde auf dem LightCycler® 96 erfolgreich etabliert und die mögliche Durchführung der HRM-Analysen auch auf zwei weiteren Geräten (LightCycler® 480 und Rotor-Gene Q) geprüft. Hier zeigte sich, dass der Rotor-Gene Q ebenso alle vier Impfstoffe, der LightCycler® 480 hingegen aufgrund einer schlechteren Auflösung nur drei Impfstoffe unterscheiden kann.

Die entwickelte Methode bietet eine erhebliche Zeitersparnis, da die derzeitige Unterscheidung anhand der phänotypischen Merkmale eine Inkubation von 18-24 Stunden (LAH-Impfstämme) beziehungsweise 18-48 Stunden (IDT-Impfstämme) benötigt. Die Laufdauer der entwickelten HRM-Analyse hingegen beträgt nur 1,5 Stunden.

VII SUMMARY

Traditional ways for *Salmonella* subtyping are rather time and cost intensive. Within this study different molecularbiological approaches were tested aiming to complement the existing spectrum of *Salmonella* subtyping methods or, if possible, even replace them. To accomplish this, a combination of three multiplex-PCRs (RAJTAK et al., 2011) and a High Resolution Melt Analysis (BRATCHIKOV & MAURICAS, 2011) have been applied and evaluated. An additional goal was to develop an HRM assay to discriminate live vaccine strains (*Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium) from their respective field strains. Here the genetic background of the vaccine strains was analysed, possible mutation sites were identified and subsequently sequenced.

For *Salmonella* serovar differentiation by means of multiplex PCR 210 strains including 31 serovars were used. However, with this method only a handful of the used serovars (*Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Goldcoast, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (1,4,[5],12:i:-), *Salmonella* Subspezies IIIb, *Salmonella* Enteritidis and IDT *Salmonella* Enteritidis vaccine strain) could be clearly identified. The remaining serovars could be grouped roughly, forming ten clusters. Those groups can contain up to ten different serovars though. In addition, it was not possible to clearly discern the important serovars *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. Nevertheless, the approach can be useful for solving certain questions such as the differentiation of the distinguishable serovars.

Better results were obtained using HRM Analysis. Here all 100 strains used in this study (21 serovars) were discriminated within a single run using the LightCycler® 96. For better discrimination of Serovar *Salmonella* Typhimurium additional assays targeting the *Salmonella* Typhimurium variants O5-negative (1,4,12:i:1,2) and monophasic (1,4,[5],12:i:-) were tested. With these additions it was possible to discern the *Salmonella* Typhimurium-monophasic variant (1,4,[5],12:i:-) by adding the primerpair FljB-1,2;1,5 (RAJTAK et al., 2011) to the setup. The discrimination of *Salmonella* Typhimurium variant O5-negative (1,4,12:i:1,2) was only partially successful. However, the discrimination of those variants is not needed necessarily, since the regulations concerning the discrimination of *Salmonella* either deem all *Salmonella* Typhimurium variants the same (poultry *Salmonella* regulation) or refer to all serovars in general (cattle *Salmonella* regulation and others). Therefore, concerning the legal requirements, a further distinction is not necessary. Nevertheless, it

offers another useful possibility to further investigate *Salmonella* Typhimurium samples, if required. More important this means no disadvantage in comparison to the serological discrimination because of the only partial discrimination of the variant O5-negative. To fully validate this molecular biological method, it should be used alongside the conventional diagnostic methods. This is especially important for the assessment of serovars that were not captured within this study. This method shows great potential for rapid *Salmonella* serovar discrimination at roughly the same costs and should be investigated further. However it has to be pointed out, that this method requires one of the specific HRM-capable devices.

For molecularbiological discrimination of live vaccine strains and the according field strains, HRM assays were successfully established. This was achieved using several single nucleotide polymorphism (SNP) found via sequencing. Using those SNPs it is possible to discern all four in Germany licensed poultry live vaccine strains. The assay was successfully established on the LightCycler® 96 and comparative runs on two other devices (LightCycler® 480 and Rotor-Gene Q) were executed. Those comparative runs showed the same discriminatory power for the Rotor-Gene Q as was the case with the LightCycler® 96, since both devices were able to discern all four vacciness. The LightCycler® 480 however failed to discriminate one of the four strains.

With this method, it is possible to discern the tested vaccine strains within a single run (1.5 hours) and therefore gains a much quicker way for vaccine strain discrimination than the conventional phenotypical differentiation method, which requires an incubation time of 18-48 hours.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

Alifano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* 1996; 60: 44-69.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.

Arrach N, Porwollik S, Cheng P, Cho A, Long F, Choi SH, McClelland M. Salmonella serovar identification using PCR-based detection of gene presence and absence. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2581-9.

Bai M, Wang C, Yin H, Tian Y, Li J, Touchdown PCR. Evaluation of different reaction systems for HRM analysis in apple. *Bioscience* 2012; 3: 1-6.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52.

Bauer J, Hörmansdorfer S. Salmonellosis in farm animals. *Fleischwirtschaft* 1996; 76: 726-8.

Baumler AJ. The record of horizontal gene transfer in Salmonella. *Trends Microbiol* 1997; 5: 318-22.

Bennett IL, Hook EW. Infectious Diseases. *Annual Review of Medicine* 1959; 10: 1-20.

Beverley PC. Immunology of vaccination. *Br Med Bull* 2002; 62: 15-28.

Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet* 2005; 366: 749-62.

Blaser MJ, Feldman RA. From the centers for disease control. Salmonella bacteremia: reports to the Centers for Disease Control, 1968-1979. *J Infect Dis* 1981; 143: 743-6.

Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. Rev Infect Dis 1982; 4: 1096-106.

Boqvist S, Hansson I, Nord Bjerselius U, Hamilton C, Wahlstrom H, Noll B, Tysen E, Engvall A. Salmonella isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. Acta Vet Scand 2003; 44: 181-97.

Boxrud D, Pederson-Gulrud K, Wotton J, Medus C, Lyszkowicz E, Besser J, Bartkus JM. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. J Clin Microbiol 2007; 45: 536-43.

Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. genotyping HRM application for *Salmonella* spp. subtyping. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71: 192-200.

Chatfield S, Roberts M, Londono P, Cropley I, Douce G, Dougan G. The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. FEMS Immunology & Medical Microbiology 1993; 7: 1-7.

Chertov O, Obukhov AN, Lipkin VM. RNA polymerase-rifamycin. A molecular model of inhibition. Bioorg Khim 1983; 9: 633-40.

Chittum HS, Champney WS. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1994; 176: 6192-8.

Chiu CH, Lin TY, Ou JT. Prevalence of the virulence plasmids of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from humans and their association with bacteremia. Microbiol Immunol 1999; 43: 899-903.

Dahme E, Weiss E. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke Verlag, Stuttgart 2007; 6. Auflage: 138.

Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 405-28.

De Smedt JM, Chartron S, Cordier JL, Graff E, Hoekstra H, Lecoupeau JP, Lindblom M, Milas J, Morgan RM, Nowacki R, O'Donoghue D, Van Gestel G, Varmedal M. Collaborative study of the international office of cocoa, chocolate and sugar confectionery on *Salmonella* detection from cocoa and chocolate processing environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* 1991; 13: 301-8.

De Zutter L, De Smedt JM, Abrams R, Beckers H, Catteau M, de Borchgrave J, Debevere J, Hoekstra J, Jonkers F, Lenges J, Notermans S, van Damme L, Vandermeersch R, Verbraeken R, Waes G. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. *International Journal of Food Microbiology* 1991; 13: 11-20.

Derzelle S, Mendy C, Laroche S, Madani N. Use of High-Resolution Melting and Melting Temperature-shift assays for specific detection and identification of *Bacillus anthracis* based on single nucleotide discrimination. *J Microbiol Methods* 2011; 87: 195-201.

Dimovski K, Cao H, Wijburg OL, Strugnell RA, Mantena RK, Whipp M, Hogg G, Holt KE. Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health investigation based on measured mutation rates and whole-genome sequence comparisons. *J Bacteriol* 2014; 196: 3036-44.

Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A. Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes* 2008; 1: 14.

Doublet B, Schwarz S, Kehrenberg C, Cloeckaert A. Florfenicol resistance gene *floR* is part of a novel transposon. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2106-8.

Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA - its role and potential in food analysis. *Food Chem* 2014; 158: 245-54.

Erlich H, Gelfand D, Sninsky J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991; 252: 1643-51.

Fani R, Brilli M, Fondi M, Lio P. The role of gene fusions in the evolution of metabolic pathways: the histidine biosynthesis case. *BMC Evol Biol* 2007; 7 Suppl 2: S4.

Fereidouni SR, Harder TC, Gaidet N, Ziller M, Hoffmann B, Hammoumi S, Globig A, Starick E. Saving resources: avian influenza surveillance using pooled swab samples and reduced reaction volumes in real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2012; 186: 119-25.

Fortini D, Ciammaruconi A, De Santis R, Fasanella A, Battisti A, D'Amelio R, Lista F, Cassone A, Carattoli A. Optimization of high-resolution melting analysis for low-cost and rapid screening of allelic variants of *Bacillus anthracis* by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Clin Chem* 2007; 53: 1377-80.

Friedrich A, Dorn C, Schroeter A, Szabo I, Jaber M, Berendonk G, Brom M, Ledwolorz J, Helmuth R. Report on *Salmonella* isolates in livestock, food and feed, received at the German national reference laboratory for *Salmonella* during 2004-2008. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2010; 123: 265-77.

Galán JE. *Salmonella* interactions with host cells: Type III Secretion at Work. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2001; 17: 53-86.

Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris A. Adulterations in Basmati rice detected quantitatively by combined use of microsatellite and fragrance typing with High Resolution Melting (HRM) analysis. *Food Chem* 2011; 129: 652-9.

Gassner G. Ein neuer Dreifarben-nähr-boden zur Typhus-Ruhr-Diagnose. *Centralbl. f. Bakt. I. Orig.* 1918; 80: 219-22.

Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 213-24.

Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the Salmonella serovars, 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France 2007; 1-167.

Gurtler V, Grando D, Mayall BC, Wang J, Ghaly-Derias S. A novel method for simultaneous Enterococcus species identification/typing and van genotyping by high resolution melt analysis. J Microbiol Methods 2012; 90: 167-81.

Haesebrouck F, Pasmans F, Chiers K, Maes D, Ducatelle R, Decostere A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? Vet Microbiol 2004; 100: 255-68.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41: 95-8.

Hargreaves KR, Flores CO, Lawley TD, Clokie MR. Abundant and Diverse Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Spacers in Clostridium difficile Strains and Prophages Target Multiple Phage Types within This Pathogen. MBio 2014; 5.

Haubrich WS. Eberth of Eberthella Typhosa. Gastroenterology 2012; 122: 852.

Hauser E, Junker E, Helmuth R, Malorny B. Different mutations in the oafA gene lead to loss of O5-antigen expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. J Appl Microbiol 2011; 110: 248-53.

Heller MJ. DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. Annual Review of Biomedical Engineering 2002; 4: 129-53.

Herrera-Leon S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of Salmonella serotypes. Res Microbiol 2007; 158: 122-7.

Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006; 52: 494-503.

Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 2007; 53: 1544-8.

Hu H, Zhang Q, Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3984-91.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 2014; 165: 526-30.

Jeffries L. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J Clin Pathol* 1959; 12: 568-71.

Jin DJ, Gross CA. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. *J Mol Biol* 1988; 202: 45-58.

Juliao PC, Marrs CF, Xie J, Gilsdorf JR. Histidine auxotrophy in commensal and disease-causing nontypeable *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 2007; 189: 4994-5001.

Kang MS, Kwon YK, Kim HR, Oh JY, Kim MJ, An BK, Shin EG, Kwon JH, Park CK. Differential identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum and the biovar Gallinarum live vaccine strain 9R. *Vet Microbiol* 2012; 160: 491-5.

Katscher F. *Salmonella* or *Smithella*?. *Nature* 1997; 388: 320.

Kessler C, Hartmann GR. The two effects of rifampicin on the RNA polymerase reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 74: 50-6.

Koo FC, Peterson JW, Houston CW, Molina NC. Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect Immun* 1984; 43: 93-100.

Koopmann JO, Hammerling GJ, Momburg F. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 80-8.

Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007; 23: 1289-91.

Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG, Jr., Sulakvelidze A. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental salmonella strains. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1626-35.

Krenkova P, Norambuena P, Stambergova A, Macek M, Jr. Evaluation of high-resolution melting (HRM) for mutation scanning of selected exons of the CFTR gene. *Folia Biol (Praha)* 2009; 55: 238-42.

Kulis-Horn RK, Persicke M, Kalinowski J. Histidine biosynthesis, its regulation and biotechnological application in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Biotechnol* 2014; 7: 5-25.

Le Hello S, Brisabois A, Accou-Demartin M, Josse A, Marault M, Francart S, Da Silva NJ, Weill FX. Foodborne outbreak and nonmotile *Salmonella enterica* variant, France. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 132-4.

Lennon-Dumenil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudriere-Gesbert C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 15-21.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* 2004; 50: 1156-64.

Lisitsyn NA, Gur'ev SO, Sverdlov ED, Moiseeva EP, Nikiforov VG. Nucleotide substitutions in the rpoB gene leading to rifampicin resistance of E. coli RNA polymerase. Bioorg Khim 1984; 10: 127-8.

Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W, Weiner HL. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4⁺ T cells to secrete IL-4. Int Immunol 1998; 10: 1017-26.

Lovmar M, Nilsson K, Lukk E, Vimberg V, Tenson T, Ehrenberg M. Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. EMBO J 2009; 28: 736-44.

Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol 2002; 14: 129-35.

Macconkey A. Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. J Hyg (Lond) 1905; 5: 333-79.

Madic J, Hajsig D, Sostaric B, Curic S, Seol B, Naglic T, Cvetnic Z. An outbreak of abortion in mares associated with Salmonella abortusequi infection. Equine Vet J 1997; 29: 230-3.

Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. J Vet Intern Med 2011; 25: 1195-208.

Marquez M, Huyvaert M, Perry JR, Pearson RD, Falchi M, Morris AP, Vivequin S, Lobbens S, Yengo L, Gaget S, Pattou F, Poulain-Godefroy O, Charpentier G, Carlsson LM, Jacobson P, Sjostrom L, Lantieri O, Heude B, Walley A, Balkau B, Marre M, Froguel P, Cauchi S. Low-frequency variants in HMGA1 are not associated with type 2 diabetes risk. Diabetes 2012; 61: 524-30.

Martin M, Resch K. Immunologie. Eugen Ulmer KG, Stuttgart 2009; 1. Auflage: 172.

Martinez-Ballesteros I, Paglietti B, Rementeria A, Laorden L, Garcia-Ricobaraza M, Bikandi J, Rubino S, Garaizar J. Intra- and inter-laboratory evaluation of an improved multiplex-PCR method for detection and typing of *Salmonella*. *J Infect Dev Ctries* 2012; 6: 443-51.

Mauder N, Rau J. Identification of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis Vaccine Strains by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Aspects of food control and animal health* 2014; 1: 1-15.

McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J Biol Chem* 1978; 253: 8949-56.

McCullough NB, Eisele CW. Experimental Human Salmonellosis: IV. Pathogenicity of Strains of *Salmonella pullorum* Obtained from Spray-Dried Whole Egg. *J Infect Dis* 1951; 89: 259-65.

McQuiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, Gheesling L, Brenner F, Fields PI. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1923-32.

Methner U, Barrow PA, Berndt A, Steinbach G. Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. *International Journal of Food Microbiology* 1999; 49: 35-42.

Mormann S, Lomker A, Ruckert C, Gaigalat L, Tauch A, Puhler A, Kalinowski J. Random mutagenesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 using an IS6100-based transposon vector identified the last unknown gene in the histidine biosynthesis pathway. *BMC Genomics* 2006; 7: 205.

Neena, Asnani PJ. Structural and functional changes in rabbit ileum by purified extracellular phospholipase A of *Salmonella newport*. *Folia Microbiol (Praha)* 1991; 36: 572-7.

Nielsen LR. Review of pathogenesis and diagnostic methods of immediate relevance for epidemiology and control of *Salmonella* Dublin in cattle. *Vet Microbiol* 2013; 162: 1-9.

Norambuena PA, Copeland JA, Křenková P, Štambergová A, Macek Jr M. Diagnostic method validation: High resolution melting (HRM) of small amplicons genotyping for the most common variants in the MTHFR gene. *Clinical Biochemistry* 2009; 42: 1308-16.

Nurmi E, Rantala M. New Aspects of Salmonella Infection in Broiler Production. *Nature* 1973; 241: 210-1.

Ovchinnikov A, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Lipkin VM, Sverdlov ED, Kiver IF, Bass IA, Mindlin SZ, Danilevskaya ON, Khesin RB. Primary structure of Escherichia coli RNA polymerase nucleotide substitution in the beta subunit gene of the rifampicin resistant rpoB255 mutant. *Mol Gen Genet* 1981a; 184: 536-8.

Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Gubanov VV, Guryev SO, Chertov O, Modyanov NN, Grinkevich VA, Makarova IA, Marchenko TV, Polovnikova IN, Lipkin VM, Sverdlov ED. The primary structure of Escherichia coli RNA polymerase. Nucleotide sequence of the rpoB gene and amino-acid sequence of the beta-subunit. *Eur J Biochem* 1981b; 116: 621-9.

Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Guriev SO, Kalinina NF, Sverdlov ED, Gragerov AI, Bass IA, Kiver IF, Moiseyeva EP, Igumnov VN, Mindlin SZ, Nikiforov VG, Khesin RB. RNA polymerase rifampicin resistance mutations in Escherichia coli: sequence changes and dominance. *Mol Gen Genet* 1983; 190: 344-8.

Pang J-C, Chiu T-H, Helmuth R, Schroeter A, Guerra B, Tsen H-Y. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 116: 305-12.

Pardon P, Sanchis R, Marly J, Lantier F, Pepin M, Popoff M. Ovine salmonellosis caused by Salmonella abortus ovis. *Ann Rech Vet* 1988; 19: 221-35.

Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 2444-8.

Pharmacopoeia E. Third Edition, Supplement 2001, 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products. 2001.

Pornprasert S, Wiengkum T, Srithep S, Chainoi I, Singboottra P, Wongwiwatthananut S. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian and Thai type deletions and beta-thalassemia 3.5-kb deletion by single-tube multiplex real-time PCR with SYBR GreenI and high-resolution melting analysis. Korean J Lab Med 2011; 31: 138-42.

Porwollik S, Boyd EF, Choy C, Cheng P, Florea L, Proctor E, McClelland M. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. J Bacteriol 2004; 186: 5883-98.

Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology 2005; 151: 653-63.

Price EP, Smith H, Huygens F, Giffard PM. High-resolution DNA melt curve analysis of the clustered, regularly interspaced short-palindromic-repeat locus of *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 3431-6.

Rajtak U, Leonard N, Bolton D, Fanning S. A real-time multiplex SYBR Green I polymerase chain reaction assay for rapid screening of salmonella serotypes prevalent in the European Union. Foodborne Pathog Dis 2011; 8: 769-80.

Rambach A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 301-3.

Rappaport F, Konforti N, Navon B. A new enrichment medium for certain *Salmonellae*. J Clin Pathol 1956; 9: 261-6.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 2007; 8: 597-608.

Ribeiro SA, de Paiva JB, Zotesso F, Lemos MV, Berchieri Janior A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 184-8.

Royo J, Muñiz LM, Hueros G. Robust and efficient genotyping of factor V and prothrombin alleles using amplicon high-resolution melting and synthetic DNA controls: Validation of the test with three different commercial chemistries. *Clinical Biochemistry* 2011; 44: 1025-7.

Salmonella Subcommittee. The Genus *Salmonella* Lignieres, 1900. *J Hyg (Lond)* 1934; 34: 333-50.

Scaria J, Palaniappan RU, Chiu D, Phan JA, Ponnala L, McDonough P, Grohn YT, Porwollik S, McClelland M, Chiou CS, Chu C, Chang YF. Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars. *Mol Cell Probes* 2008; 22: 238-43.

Schoder D, Schmalwieser A, Schauburger G, Hoorfar J, Kuhn M, Wagner M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2724-8.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev* 1996; 60: 167-215.

Selbitz H-J, Moos M. Tierärztliche Impfpraxis. Enke Verlag, Stuttgart 2006; 3. Auflage: 2-9, 98-9.

Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, Rolle MB, Mayr AB. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart 2011; 9. Auflage: 199-214.

Shahid MA, Markham PF, Marenda MS, Agnew-Crumpton R, Noormohammadi AH. High-resolution melting-curve analysis of *obg* gene to differentiate the temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H from non-temperature-sensitive strains. *PLoS One* 2014; 9: e92215.

Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2959-65.

Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in Microbiology* 1996; 4: 22-9.

Siegmann O, Neumann U. Kompendium der Geflügelkrankheiten. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover 2012; 7. Auflage: 225-32.

Stephens KW, Hutchins RJ, Dauphin LA. Cross-platform evaluation of commercial real-time reverse transcription PCR master mix kits using a quantitative 5'nuclease assay for Ebola virus. *Mol Cell Probes* 2010; 24: 370-5.

Sukhnanand S, Alcaine S, Warnick LD, Su WL, Hof J, Craver MP, McDonough P, Boor KJ, Wiedmann M. DNA sequence-based subtyping and evolutionary analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3688-98.

Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am J Pathol* 1967; 50: 109-36.

Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Liebana E, Kornschöber C, Allerberger F, Hachler H, Bodrossy L. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 23-36.

Taylor WI. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.* 1965; 44: 471-5.

Tennant SM, Wang JY, Galen JE, Simon R, Pasetti MF, Gat O, Levine MM. Engineering and preclinical evaluation of attenuated nontyphoidal *Salmonella* strains serving as live oral vaccines and as reagent strains. *Infect Immun* 2011; 79: 4175-85.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.

Torpdahl M, Sørensen G, Lindstedt B-A, Nielsen E. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella* Typhimurium infections. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 388-95.

Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 251-76.

Ugo V, Tondeur S, Menot M-L, Bonnin N, Le Gac G, Tonetti C, Mas VM-D, Lecucq L, Kiladjian J-J, Chomienne C, Dosquet C, Parquet N, Darnige L, Porneuf M, Escoffre-Barbe M, Giraudier S, Delabesse E, Cassinat B. Interlaboratory Development and Validation of a HRM Method Applied to the Detection of JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera Patients. *PLoS One* 2010; 5: e8893.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: e115.

Van Asten A, van Dijk JE. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2005; 44: 251-9.

Venables SJ, Mehta B, Daniel R, Walsh SJ, van Oorschot RA, McNevin D. Assessment of high resolution melting (HRM) analysis as a potential SNP genotyping technique in forensic casework. *Electrophoresis* 2014; 35: 3036-43.

Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1-12.

Voet D, Voet JG. Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994; 1. Auflage (korrigierter Nachdruck): 728-9, 746-9.

Wegener HC, Hald T, Lo Fo Wong D, Madsen M, Korsgaard H, Bager F, Gerner-Smidt P, Molbak K. Salmonella control programs in Denmark. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 774-80.

Wichelhaus TA, Schafer V, Brade V, Boddingtonhaus B. Molecular characterization of *rpoB* mutations conferring cross-resistance to rifamycins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2813-6.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49: 853-60.

Wright A. Mechanism of conversion of the salmonella O antigen by bacteriophageepsilon 34. *J Bacteriol* 1971; 105: 927-36.

Zeinzinger J, Pietzka AT, Stoger A, Kornschöber C, Kunert R, Allerberger F, Mach R, Ruppitsch W. One-step triplex high-resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 3352-60.

IX ANHANG

Anhang 1: Überblick über die Ergebnisse der PCR I für die 210 geprüften Proben.

Legende: # : PCR-Wiederholung mit ursprünglicher Probe

\$: PCR-Wiederholung nach Extraktionswiederholung

	Serovar	PCR I						
		<i>fliC(l,v), flijB(l,w)</i> (92 bp)	<i>fliC(f,g), fliC(f,g,s), fliC(f,g,t), fliC(g,s,t)</i> (130 bp)	<i>fliC(i)</i> (143 bp)	<i>floR</i> (142 bp)	<i>sdr</i> (144 bp)	ct (30) (dR 2000)	Bande in der Gelelektrophorese (NTC bei ~ 40 bp)
1	S. Typhimurium B	\	\	83.3	\	\	19.01	Bande bei ~ 145
2	S. Typhimurium B	\	\	83.3	\	\	17.20	
3	S. Typhimurium B	\	\	83.3	\	\	18.21	
4	S. Typhimurium B	\	\	83.4	\	\	18.06	
5	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	\	\	83.4	\	\	19.98	
6	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	\	\	83.4	\	\	18.29	
7	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	\	\	83.5	\	\	20.77	Starke Bande bei ~ 145
8	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	83.5	\	\	20.60	Starke Bande bei ~ 145
9	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	82.8	86.9	\	18.77	Starke Bande bei ~ 145
10	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	82.9	86.9	\	18.31	
11	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	82.9	86.9	\	19.53	
12	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	82.9	86.9	\	19.52	
13	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)	\	\	83.4	\	\	19.56	
14	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	83.5	\	\	19.73	
15	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	83.5	\	\	19.41	
16	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	83.3	\	\	19.74	
17	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	83.3	\	\	20.07	
18	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)	\	\	82.9	86.9	\	18.87	
19	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)	\	\	83.4	\	\	19.44	
20	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	24.98	Starke Bande bei ~ 145
21	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	27.39	
22	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	25.27	
23	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	26.46	
24	S. Typhimurium	\	\	83.0	86.9	\	24.53	Starke Bande bei ~ 145
25	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	27.26	
26	S. Typhimurium	\	\	83.0	86.9	\	22.56	
27	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	29.29	
28	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	24.82	
29	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	27.76	
30	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	25.98	
31	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	\	\	83.5	\	\	25.08	
32	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	25.24	
33	S. Typhimurium	\	\	83.5	\	\	24.55	
34	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	\	\	83.5	\	\	27.75	

35	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	83.5	\	\	27.40	
36	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	25.31	
37	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	26.44	
38	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	21.42	
39	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	23.94	
40	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	22.80	
41	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	23.48	
42	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	22.20	
43	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	25.71	
44	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	22.14	
45	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	23.33	
46	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	22.96	
47	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	21.82	
48	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	24.50	
49	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	20.48	
50	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	24.03	
51	S. Typhimurium		\	\	84.0	\	\	19.47	
52	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	25.69	
53	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	22.13	
54	S. Typhimurium DT 195		\	\	83.5	\	\	22.42	
55	S. Typhimurium RDNC		\	\	83.5	\	\	21.10	
56	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.32	Schwache Bande bei ~ 40 bp
57	S. Abony		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.67	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
58	S. Agona		\	81.1	\	\	\	17.75	
59	S. Agona		\	81.1	\	\	\	17.59	Bande bei ~ 130 bp
60	S. Agona		\	81.2	\	\	\	19.59	
61	S. Agona		\	81.7	\	\	\	17.36	
62	S. Anatum		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.63	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
63	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	38.21	
64	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.89	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
65	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	38.66	
66	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.50	
67	S. Bredeney		79.6	\	\	\	\	21.10	
68	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	18.16	
69	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	19.24	
70	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	19.00	Starke Bande bei ~ 90 bp
71	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	19.51	
72	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	19.08	
73	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	20.78	
74	S. Bredeney		79.6	\	\	\	\	19.53	
75	S. Bredeney		79.6	\	\	\	\	21.18	
76	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.01	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
76	S. Bredeney	#	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.79	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
76	S. Bredeney	\$	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	31.05	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
77	S. Bredeney		79.7	\	\	\	\	18.51	
78	S. Derby		\	81.2	\	\	\	19.63	
79	S. Derby		\	81.2	\	\	\	18.19	
80	S. Derby		\	81.2	\	\	\	17.75	

81	S. Derby		\	80.6	\	\	\	17.07	Keine abgegrenzte Bande
81	S. Derby	#	\	80.5	\	\	\	14.84	Starke Bande bei ~ 130 bp
82	S. Derby		\	80.6	\	\	\	17.40	
83	S. Derby		\	80.6	\	\	\	16.99	
84	S. Derby		\	80.7	\	\	\	18.12	
85	S. Derby		\	80.7	\	\	\	17.53	
86	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.24	Schwache Banden bei ~ 40 bp und ~ 140 bp
86	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.60	
87	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.03	Schwache Bande bei ~ 40 bp
87	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.30	
88	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.20	Bande bei ~ 140 bp, schwache Bande bei ~ 40 bp
88	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.26	
89	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.7	19.88	
90	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.7	21.41	
91	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.8	19.38	
92	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.8	23.09	
93	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.83	Sehr schwache Bande bei ~ 140 bp
93	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.86	
94	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.2	18.86	
95	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.3	20.44	Keine Bande Starke Bande bei ~ 145 bp
95	S. Enteritidis	#	\	\	\	\	86.4	20.56	
96	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.3	19.68	
97	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.7	18.27	
98	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.7	17.50	
99	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.8	17.30	
100	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.9	20.20	
101	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	18.60	
102	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	19.18	
103	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	17.79	Starke Bande bei ~ 145 bp
103	S. Enteritidis	\$	\	\	\	\	86.4	18.54	
104	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	17.72	
105	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	19.41	
106	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	17.75	Keine Bande
107	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	17.82	
108	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	17.71	
109	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	17.37	
110	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	17.87	
111	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.4	18.88	
112	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	18.03	
113	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.0	18.48	
114	S. Goldcoast		80.4	\	\	\	\	18.38	
115	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.29	
116	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.51	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
117	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.34	
118	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.00	Keine Bande
119	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.87	

120	S. Indiana		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.58	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
121	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.27	
122	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.15	Schwache Bande bei ~ 40 bp
123	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.49	
124	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.36	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
125	S. Infantis	\$	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.75	
125	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.49	
126	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.04	
127	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.74	
128	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.82	
129	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.87	
130	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.37	
131	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.56	
132	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.37	
133	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.04	
134	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.53	Schwache Bande bei ~ 40 bp
135	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.79	Schwache Bande bei ~ 40 bp
136	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.16	
137	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.61	
138	S. Kentucky	#	\	\	83.8	\	\	19.21	Keine abgegrenzte Bande
138	S. Kentucky		\	\	83.3	\	\	19.40	Starke Bande bei ~ 145 bp
139	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.66	Schwache Bande bei ~ 40 bp
140	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.20	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
141	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.06	
142	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.90	
143	S. Lexington		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.87	Keine Bande
144	S. Livingstone		80.9	\	\	\	\	22.87	
145	S. Livingstone		81.4	\	\	\	\	18.78	Bande bei ~ 90 bp
146	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.36	
147	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.74	Keine Bande
148	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.27	
149	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.78	Keine Bande
150	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.53	
151	S. Montevideo		\	82.4	\	\	\	18.81	
152	S. Montevideo		\	82.4	\	\	\	17.71	Bande bei ~ 130 bp
153	S. Montevideo		\	82.4	\	\	\	18.62	
154	S. Ohio		79.7	\	\	\	\	23.79	
155	S. Ohio		79.2	\	\	\	\	19.29	
156	S. Ohio		80.3	\	\	\	\	18.61	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
157	S. Ohio		80.3	\	\	\	\	18.63	
158	S. Rissen		\	81.3	\	\	\	17.59	Starke Bande bei ~ 130 bp
159	S. Schleissheim		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.61	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
160	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.81	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
161	S. Senftenberg		\	82.9	\	\	\	21.55	Starke Bande bei ~ 130 bp
162	S. Senftenberg		\	81.3	\	\	\	19.36	

163	S. Senftenberg		\	81.3	\	\	\	18.14	
164	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.9	16.90	
165	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.4	17.42	
166	S. Enteritidis		\	\	\	\	87.5	17.86	
167	S. Enteritidis		\	\	\	\	88.0	19.68	
168	S. Enteritidis		\	\	\	\	88.0	17.78	
169	S. Enteritidis		\	\	\	\	88.5	17.66	Keine Bande Starke Bande bei ~ 145 bp
169	S. Enteritidis	#	\	\	\	\	86.7	17.26	
170	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.9	17.97	
171	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.9	17.31	
172	S. Subspezies IIIb		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.01	Sehr schwache Bande bei ~ 145 bp
173	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	83.9	\	\	19.55	
174	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	84.4	\	\	19.03	
175	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	84.9	\	\	20.03	Schwache Bande bei ~ 145 bp
176	S. Glostrup		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	38.44	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
177	S. Rissen		\	80.5	\	\	\	22.13	Starke Bande bei ~ 120 bp, schwache bei ~ 40 bp
178	S. Typhimurium		\	\	83.5	\	\	20.75	
179	S. Give		79.5	\	\	\	\	21.55	Bande bei ~ 90 bp, schwache bei ~ 40 bp
180	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	37.56	
181	S. Choleraesuis		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	28.02	Schwache Bande bei ~ 40 bp
181	S. Choleraesuis	\$	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	36.86	
182	S. Rissen		\	80.7	\	\	\	20.15	
183	S. Give		79.2	\	\	\	\	18.49	
184	S. Subspezies IIIb		\	\	83.8	\	\	19.17	Starke Bande bei ~ 145 bp
185	S. Subspezies IIIb		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.97	
186	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.63	
187	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	35.56	
188	S. Kentucky		\	\	83.3	\	\	19.22	
189	S. Kentucky		\	\	83.4	\	\	20.54	Starke Bande bei ~ 145 bp
190	S. Kentucky		\	\	83.3	\	\	19.04	
191	S. Kentucky		\	\	83.3	\	\	20.61	
192	S. Kentucky		\	\	83.3	\	\	18.66	
193	S. Virchow		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	33.59	
194	S. Virchow		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	33.29	
195	S. Virchow		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	31.56	
196	S. Virchow		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	33.86	Schwache Bande bei ~ 40 bp
197	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.23	
198	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	34.15	
199	IDT – Impfstamm (S.T.)		\	\	83.3	\	\	20.79	Starke Bande bei ~ 145 bp
200	IDT – Impfstamm (S.E.)		\	\	\	\	86.4	20.94	Starke Bande bei ~ 145 bp
201	LAH – Impfstamm (S.T.)		\	\	83.5	\	\	20.49	
202	LAH – Impfstamm (S.E.)		\	\	\	\	86.5	20.37	
203	S. Livingstone		79.9	\	\	\	\	20.11	
204	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	83.0	\	\	20.12	
205	S. Typhimurium		\	\	83.0	\	\	20.14	

206	S. Typhimurium		\	\	83.0	\	\	19.58	
207	S. Enteritidis		\	\	\	\	86.5	18.41	
208	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)		\	\	83.5	\	\	20.89	
209	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	\	83.5	\	\	20.39	
210	S. Typhimurium		\	\	83.0	\	\	20.01	

Anhang 2: Überblick über die Ergebnisse der PCR II-G1 für die 210 geprüften Proben.

Legende: # : PCR-Wiederholung mit ursprünglicher Probe

\$: PCR-Wiederholung nach Extraktionswiederholung

	Serovar		PCR II-G1				
			<i>fliC</i> (d) (136 bp)	<i>fliC</i> (r,i) (111 bp)	<i>fliC</i> (b) (148 bp)	ct (30) (dR 2000)	Bande in der Gelelektrophorese (NTC bei ~ 40 bp)
1	S. Typhimurium B		\	81.1	\	20.28	Starke Bande bei ~ 110 bp
2	S. Typhimurium B		\	80.7	\	18.09	Starke Bande bei ~ 110 bp
3	S. Typhimurium B		\	80.7	\	20.39	
4	S. Typhimurium B		\	80.7	\	20.72	
5	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.7	\	22.02	
6	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	37.03	schwache Bande bei ~ 40 bp
6	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)	#	\	80.6	\	18.36	
7	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	81.2	\	20.34	Starke Bande bei ~ 110 bp
8	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	22.28	Starke Bande bei ~ 110 bp
9	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.6	\	21.28	
10	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	23.13	
11	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	21.90	
12	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	20.32	
13	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)		\	80.7	\	21.67	
14	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	20.53	
15	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	20.19	
16	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.6	\	22.38	
17	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	21.40	
18	S. Typhimurium (1,4,12:i:1,2)		\	80.7	\	20.51	
19	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)		\	80.7	\	20.99	
20	S. Typhimurium		\	81	\	21.94	Starke Bande bei ~ 110 bp
21	S. Typhimurium		\	81	\	23.01	

22	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	21.46	
23	<i>S. Typhimurium</i>		\	81.1	\	22.68	
24	<i>S. Typhimurium</i>		\	81.1	\	20.21	
25	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	21.87	
26	<i>S. Typhimurium</i>		\	81.1	\	19.39	
27	<i>S. Typhimurium</i>		\	81.1	\	22.77	
28	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	21.35	
29	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	23.88	
30	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	22.20	
31	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		\	80.6	\	20.04	
32	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	21.79	
33	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	21.79	
34	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		\	80.6	\	22.44	
35	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		\	80.6	\	21.63	
36	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	22.71	
37	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	21.73	
38	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	19.19	
39	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	19.94	
40	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	20.01	
41	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	20.46	
42	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	19.66	
43	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	22.42	
44	<i>S. Typhimurium</i>		\	81	\	19.65	
45	<i>S. Typhimurium</i>		\	81	\	19.90	
46	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	19.93	
47	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	19.52	
48	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	21.33	
49	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	18.45	
50	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.6	\	21.01	
51	<i>S. Typhimurium</i>		\	81.1	\	17.90	
52	<i>S. Typhimurium</i>		\	81	\	21.55	
53	<i>S. Typhimurium</i>		\	80.5	\	19.89	
54	<i>S. Typhimurium</i> DT 195		\	80.6	\	18.95	
55	<i>S. Typhimurium</i> RDNC		\	80.6	\	18.77	
56	<i>S. Tennessee</i>		negativ	negativ	negativ	33.85	
57	<i>S. Abony</i>		\	\	83.2	25.87	Starke Bande bei ~ 160 bp
58	<i>S. Agona</i>		negativ	negativ	negativ	37.46	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
59	<i>S. Agona</i>		negativ	negativ	negativ	36.34	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
60	<i>S. Agona</i>		negativ	negativ	negativ	36.72	Schwache Bande bei ~ 40 bp
61	<i>S. Agona</i>		negativ	negativ	negativ	36.93	Schwache Bande bei ~ 40 bp
62	<i>S. Anatum</i>		negativ	negativ	negativ	36.62	Schwache Bande bei ~ 40 bp
63	<i>S. Blockley</i>		negativ	negativ	negativ	37.52	Schwache Bande bei ~ 40 bp
64	<i>S. Blockley</i>		negativ	negativ	negativ	37.32	Schwache Bande bei ~ 40 bp

65	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	37.73	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
66	S. Blockley		negativ	negativ	negativ	36.56	Schwache Bande bei ~ 40 bp
67	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	37.15	Schwache Bande bei ~ 40 bp
68	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	35.77	Schwache Bande bei ~ 40 bp
69	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	36.63	
70	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	36.61	Schwache Bande bei ~ 40 bp
71	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	37.46	
72	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	37.06	
73	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	37.70	
74	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	36.78	
75	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	37.23	
76	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	35.69	
76	S. Bredeney	\$	negativ	negativ	negativ	31.38	
77	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	36.21	
78	S. Derby		negativ	negativ	negativ	35.88	Schwache Bande bei ~ 40 bp
79	S. Derby		negativ	negativ	negativ	35.56	
80	S. Derby		negativ	negativ	negativ	36.26	
81	S. Derby		negativ	negativ	negativ	35.04	
82	S. Derby		negativ	negativ	negativ	35.78	
83	S. Derby		negativ	negativ	negativ	34.48	
84	S. Derby		negativ	negativ	negativ	35.53	
85	S. Derby		negativ	negativ	negativ	33.58	
86	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	35.22	Schwache Banden bei ~ 40 und 120 bp
86	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	35.34	Schwache Bande bei ~ 40 bp, Bande bei ~ 110 bp
87	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	36.68	
87	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	39.20	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
88	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	36.89	
88	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	37.77	Schwache Bande bei ~ 40 bp
89	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.52	
90	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.96	Schwache Bande bei ~ 40 bp
91	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.72	
92	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.29	
93	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	36.22	
94	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.87	
95	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.33	
95	S. Enteritidis	#	negativ	negativ	negativ	32.38	Schwache Bande bei ~ 40 bp
96	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.71	
97	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.30	
98	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.63	Keine Bande
99	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.78	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
100	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	38.24	
101	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.50	
102	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.00	

103	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.01	
103	S. Enteritidis	\$	negativ	negativ	negativ	36.36	Schwache Bande bei ~ 40 bp
104	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.78	
105	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.91	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
106	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.02	
107	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.64	Keine Bande
108	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.64	
109	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.92	
110	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.95	
111	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.71	Keine Bande
112	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.76	
113	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	37.25	
114	S. Goldcoast		\	80.9	\	17.10	Schwache Bande bei ~ 110 bp
115	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	36.02	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
116	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	37.68	
117	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	36.58	
118	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	36.82	
119	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	36.40	
120	S. Indiana		negativ	negativ	negativ	36.60	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
121	S. Infantis		\	80.8	\	18.48	
122	S. Infantis		\	80.9	\	18.32	Starke Bande bei ~ 100 bp
123	S. Infantis		\	80.9	\	17.62	
124	S. Infantis		\	80.8	\	17.70	
125	S. Infantis		negativ	negativ	negativ	35.11	Banden bei ~ 30 bp und ~ 40 bp
125	S. Infantis	#	negativ	negativ	negativ	37.45	Schwache Bande bei ~ 40 bp, sehr schwache bei ~ 30 bp
125	S. Infantis	\$	negativ	negativ	negativ	30.37	
126	S. Infantis		\	80.8	\	16.93	
127	S. Infantis		\	80.8	\	18.32	
128	S. Infantis		\	80.8	\	17.96	
129	S. Infantis		\	80.8	\	17.85	
130	S. Infantis		\	80.9	\	17.87	
131	S. Infantis		\	80.9	\	17.75	
132	S. Infantis		\	80.8	\	18.17	
133	S. Infantis		\	80.8	\	17.65	
134	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	35.76	Banden bei ~ 30 bp und ~ 40 bp
135	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	35.61	Banden bei ~ 30 bp und ~ 40 bp
136	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	37.12	Banden bei ~ 30 bp und ~ 40 bp
137	S. Isangi		negativ	negativ	negativ	35.26	Banden bei ~ 30 bp und ~ 40 bp, schwache bei ~ 120 bp
138	S. Kentucky		\	80.8	\	17.91	Starke Bande bei ~ 110 bp
138	S. Kentucky	#	\	80.2	\	18.09	Starke Bande bei ~ 110 bp

139	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	34.38	Schwache Banden bei ~ 40 bp und ~ 110 bp
140	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	37.08	Schwache Bande bei ~ 40 bp
141	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	35.86	
142	S. Kottbus		negativ	negativ	negativ	36.71	
143	S. Lexington		negativ	negativ	negativ	35.87	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
144	S. Livingstone		79.3	\	\	23.28	Schwache Bande bei ~ 30 bp, Starke Bande bei ~ 130 bp
145	S. Livingstone		78.8	\	\	19.75	Bande bei ~ 135 bp
146	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	35.40	Bande bei ~ 40 bp
147	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	34.37	
148	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	34.79	
149	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	34.16	
150	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	35.30	
151	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	35.48	Bande bei ~ 40 bp
152	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	34.80	
153	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	37.94	
154	S. Ohio		\	\	83.3	22.80	
155	S. Ohio		\	\	83.4	19.46	Keine abgegrenzte Bande
155	S. Ohio	#	\	\	83.6	18.77	Bande bei ~ 150 bp
156	S. Ohio		\	\	83.4	18.83	
157	S. Ohio		\	\	83.4	18.59	
158	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	32.53	Sehr schwache Banden bei ~ 40 bp und ~ 130 bp
158	S. Rissen	#	negativ	negativ	negativ	32.93	
159	S. Schleissheim		\	\	83	24.43	Starke Bande bei ~ 150 bp
160	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	34.68	
161	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	35.32	
162	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	34.78	
163	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	35.00	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
164	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	34.61	
165	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	34.54	Keine Bande
166	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	34.87	
167	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.60	
168	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.88	Keine Bande
169	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	36.16	
170	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.02	
171	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.26	
172	S. Subspezies IIIb		\	80.8	\	26.87	Schwache Bande bei ~ 40 bp, Bande bei ~ 110 bp
173	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.8	\	17.74	
174	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.8	\	17.54	Schwache Bande bei ~ 110 bp
175	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.8	\	17.56	

176	S. Glostrup		negativ	negativ	negativ	31.11	Sehr schwache Banden bei ~ 40 bp und ~ 110 bp
177	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	38.35	Sehr schwache Banden bei ~ 40 bp und ~ 140 bp
178	S. Typhimurium		\	80.5	\	19.45	
179	S. Give		negativ	negativ	negativ	37.71	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
179	S. Give	#	negativ	negativ	negativ	35.75	
180	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	35.14	
181	S. Choleraesuis		negativ	negativ	negativ	36.40	Schwache Bande bei ~ 110 bp
182	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	34.56	
183	S. Give		negativ	negativ	negativ	37.49	
184	S. Subspezies IIIb		\	80.8	\	17.90	
185	S. Subspezies IIIb		\	80.8	\	17.27	
186	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	31.88	
187	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	35.08	
188	S. Kentucky		\	80.2	\	17.94	
189	S. Kentucky		\	80.2	\	18.53	Starke Bande bei ~ 110 bp
190	S. Kentucky		\	80.8	\	17.91	
191	S. Kentucky		\	80.8	\	18.63	
192	S. Kentucky		\	81.3	\	17.85	
193	S. Virchow		\	81.3	\	17.88	Starke Bande bei ~ 110 bp
194	S. Virchow		\	80.2	\	17.51	
195	S. Virchow		\	80.2	\	17.77	
196	S. Virchow		\	80.2	\	17.90	
197	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	35.92	
198	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	35.81	
199	IDT – Impfstamm (S.T.)		\	80.8	\	18.76	Starke Bande bei ~ 110 bp
200	IDT – Impfstamm (S.E.)		negativ	negativ	negativ	35.93	Schwache Bande bei ~ 40 bp
201	LAH – Impfstamm (S.T.)		\	80.5	\	19.41	
202	LAH – Impfstamm (S.E.)		negativ	negativ	negativ	37.60	
203	S. Livingstone		78.5	\	\	17.76	
204	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.5	\	21.27	
205	S. Typhimurium		\	80.5	\	18.34	
206	S. Typhimurium		\	80.5	\	18.64	
207	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	35.40	
208	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)		\	80.5	\	18.43	
209	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		\	80.5	\	17.56	
210	S. Typhimurium		\	80.5	\	17.97	

Anhang 3: Überblick über die Ergebnisse der PCR II-G3 für die 210 geprüften Proben.**Legende: # : PCR-Wiederholung mit ursprünglicher Probe****\$: PCR-Wiederholung nach Extraktionswiederholung**

	Serovar		PCR II-G3				Bande in der Gelelektrophorese (NTC bei ~ 50 bp)
			spv (80 bp)	<i>fljB</i> (1,2), <i>fljB</i> (1,5) (112 bp)	<i>fljB</i> (z6) (149 bp)	ct (25) (dR 2000)	
1	<i>S. Typhimurium</i> B		\	82.7	\	20.20	Starke Bande bei ~ 110 bp
2	<i>S. Typhimurium</i> B		\	82.7	\	17.76	
3	<i>S. Typhimurium</i> B		\	82.7	\	20.23	
3	<i>S. Typhimurium</i> B	#	\	82.7	\	18.87	
4	<i>S. Typhimurium</i> B		\	82.7	\	20.49	
5	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	32.21	
6	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.06	Schwache Bande bei ~ 50 bp
6	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)	#	negativ	negativ	negativ	30.85	
7	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.92	
8	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		\	82.7	\	21.17	Starke Bande bei ~ 110 bp
8	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)	#	\	82.7	\	20.96	
9	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		78.6	82.7	\	17.63	
10	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		78.6	82.7	\	17.72	Banden bei ~ 80 bp und ~ 110 bp
11	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		78.7	82.7	\	19.48	
12	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		78.6	82.7	\	19.54	
13	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.92	Schwache Bande bei ~ 50 bp
13	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:-)	#	negativ	negativ	negativ	31.97	Schwache Bande bei ~ 50 bp
14	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		79.2	83.1	\	19.84	
15	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		\	83.2	\	20.67	
16	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		79.1	83.1	\	20.15	
17	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		\	82.7	\	22.38	
18	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:1,2)		79.1	82.7	\	18.70	
19	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.28	
19	<i>S. Typhimurium</i> (1,4,12:i:-)	#	negativ	negativ	negativ	31.33	
20	<i>S. Typhimurium</i>		\	83	\	22.10	Starke Bande bei ~ 120 bp
21	<i>S. Typhimurium</i>		\	82.5	\	23.54	
22	<i>S. Typhimurium</i>		\	82.5	\	21.82	
23	<i>S. Typhimurium</i>		78.5	82.7	\	20.55	

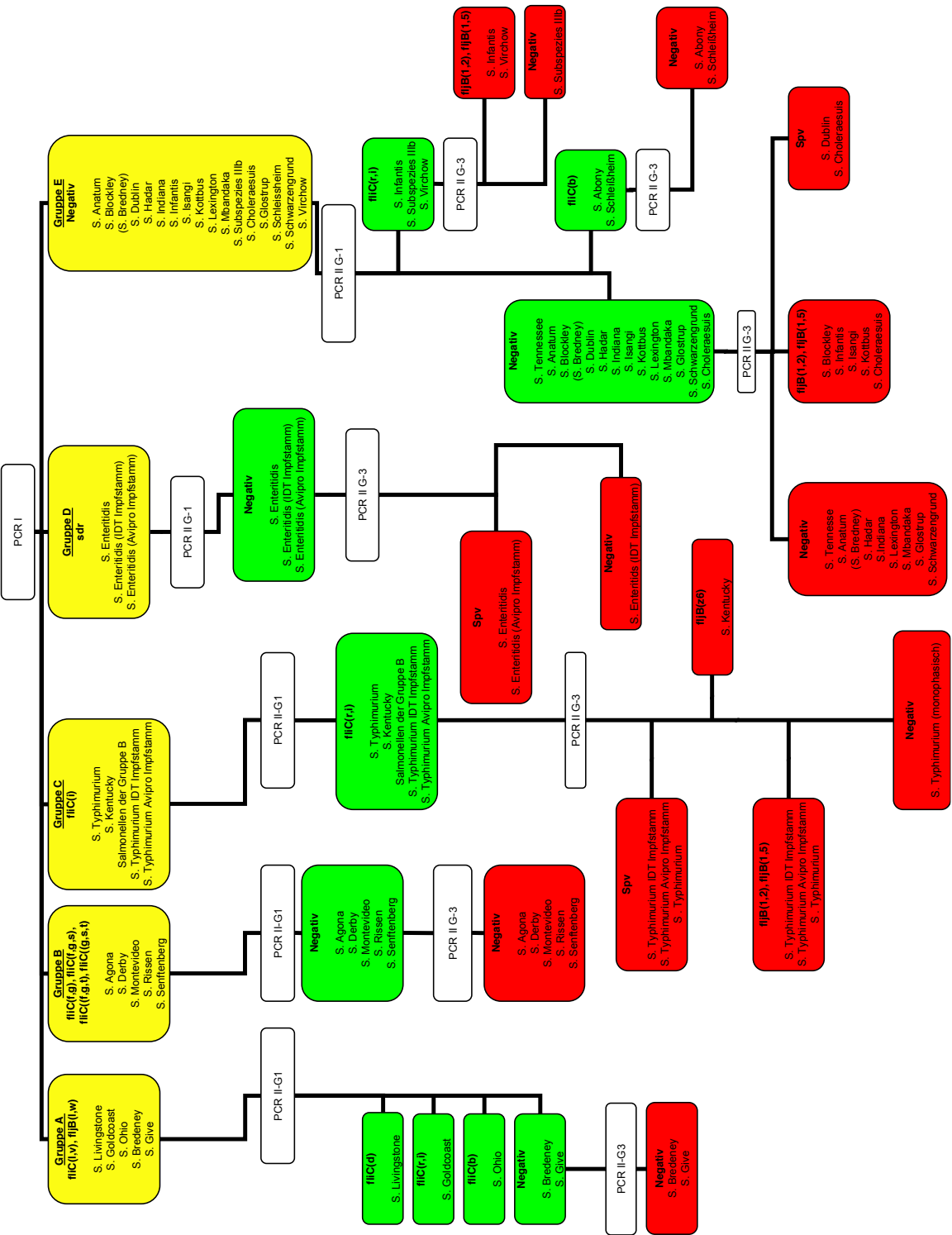
24	S. Typhimurium		79.1	82.6	\	19.27	Starke Bande bei ~ 80 bp, Bande bei ~ 120 bp
25	S. Typhimurium		79.1	82.6	\	19.64	
26	S. Typhimurium		79.1	83.2	\	17.59	
27	S. Typhimurium		79.2	82.7	\	20.22	
28	S. Typhimurium		\	82.5	\	21.72	
29	S. Typhimurium		\	82.5	\	24.00	
29	S. Typhimurium	#	\	82.5	\	22.12	
30	S. Typhimurium		\	82.5	\	21.20	
31	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.81	Schwache Bande bei ~ 50 bp
32	S. Typhimurium		78.7	82.6	\	19.84	
33	S. Typhimurium		79.1	82.7	\	19.71	Starke Bande bei ~ 80 bp, Bande bei ~ 120 bp
34	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	32.59	
35	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	31.80	
36	S. Typhimurium		\	82.5	\	22.54	
37	S. Typhimurium		\	82.5	\	21.91	
38	S. Typhimurium		\	82.5	\	18.95	
39	S. Typhimurium		\	82.6	\	20.25	
40	S. Typhimurium		\	82.6	\	20.01	
40	S. Typhimurium	#	\	82.6	\	18.88	
41	S. Typhimurium		\	82.7	\	20.64	
42	S. Typhimurium		\	82.7	\	19.42	
43	S. Typhimurium		\	82.6	\	23.05	
43	S. Typhimurium	#	\	82.6	\	20.31	
44	S. Typhimurium		\	82.5	\	19.90	
45	S. Typhimurium		\	82.5	\	20.29	
46	S. Typhimurium		\	82.5	\	20.38	
47	S. Typhimurium		\	82.6	\	19.50	
47	S. Typhimurium	#	\	83.7	\	18.44	
48	S. Typhimurium		\	82.6	\	21.06	
49	S. Typhimurium		\	82.7	\	18.42	
50	S. Typhimurium		\	83.2	\	20.72	
51	S. Typhimurium		79.1	83.2	\	16.38	
52	S. Typhimurium		79	83.2	\	19.41	
53	S. Typhimurium		\	83	\	20.48	
54	S. Typhimurium DT 195		\	82.5	\	18.60	
54	S. Typhimurium DT 195	#	\	82.7	\	17.86	
55	S. Typhimurium RDNC		79.1	82.6	\	17.60	
56	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	29.68	Keine Bande
57	S. Abony		negativ	negativ	negativ	30.08	Schwache Bande bei ~ 40 bp
58	S. Agona		negativ	negativ	negativ	30.09	
59	S. Agona		negativ	negativ	negativ	30.02	
60	S. Agona		negativ	negativ	negativ	29.89	
61	S. Agona		negativ	negativ	negativ	29.76	Schwache Bande bei ~ 40 bp
62	S. Anatum		negativ	negativ	negativ	29.58	Schwache Bande bei ~ 40 bp
63	S. Blockley		\	82.3	\	18.20	

64	S. Blockley		\	82.3	\	19.48	Starke Bande bei ~ 110 bp
65	S. Blockley		\	81.2	\	19.61	
66	S. Blockley		\	81.2	\	18.42	
67	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.74	
68	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	27.44	
69	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.18	
70	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.01	
71	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.49	Schwache Bande bei ~ 40 bp
72	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.35	
73	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	28.81	
74	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	29.13	
75	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	29.15	
76	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	29.23	
76	S. Bredeney	\$	negativ	negativ	negativ	29.97	
77	S. Bredeney		negativ	negativ	negativ	27.59	
78	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.58	
79	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.77	Sehr schwache Bande bei ~ 40 bp
80	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.91	
81	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.30	
82	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.08	
83	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.33	
84	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.37	
85	S. Derby		negativ	negativ	negativ	29.33	
86	S. Dublin		80.7	\	\	24.50	Schwache Bande bei ~ 20 bp, starke Bande bei ~ 80 bp
86	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	25.18	Bande bei ~ 50 bp, starke Bande bei ~ 80 bp
86	S. Dublin	\$	78.9	\	\	18.79	
87	S. Dublin		negativ	negativ	negativ	27.29	
87	S. Dublin	#	negativ	negativ	negativ	27.62	Banden bei ~ 80 bp und ~ 50 bp
87	S. Dublin	\$	77.9	\	\	19.04	
88	S. Dublin		80.8	\	\	19.28	Schwache Bande bei ~ 20 bp, starke Bande bei ~ 80 bp
88	S. Dublin	#	79.1	\	\	19.02	Bande bei ~ 50 bp, starke Bande bei ~ 80 bp
88	S. Dublin	\$	78.4	\	\	18.28	
89	S. Enteritidis		79.2	\	\	21.37	
90	S. Enteritidis		79.7	\	\	20.05	
91	S. Enteritidis		79.7	\	\	18.89	
92	S. Enteritidis		79.7	\	\	21.29	
93	S. Dublin		80.7	\	\	17.77	
94	S. Enteritidis		80.7	\	\	18.12	
95	S. Enteritidis		81.3	\	\	18.81	
95	S. Enteritidis	#	79.7	\	\	19.31	Keine Bande bei ~ 80 bp
96	S. Enteritidis		81.3	\	\	18.12	
97	S. Enteritidis		79.7	\	\	17.77	
98	S. Enteritidis		79.7	\	\	17.54	
99	S. Enteritidis		79.7	\	\	17.21	
100	S. Enteritidis		79.3	\	\	19.20	
101	S. Enteritidis		79.3	\	\	18.35	

102	S. Enteritidis		79.3	\	\	17.57	
103	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	29.46	Keine Bande
103	S. Enteritidis	#	negativ	negativ	negativ	31.08	
103	S. Enteritidis	\$	negativ	negativ	negativ	30.13	Schwache Bande bei ~ 50 bp
104	S. Enteritidis		79.8	\	\	16.69	
105	S. Enteritidis		79.8	\	\	18.84	
106	S. Enteritidis		80.4	\	\	17.28	
107	S. Enteritidis		80.4	\	\	17.49	
108	S. Enteritidis		79.3	\	\	17.34	
109	S. Enteritidis		79.3	\	\	17.17	
110	S. Enteritidis		79.3	\	\	17.29	
111	S. Enteritidis		79.8	\	\	18.23	
112	S. Enteritidis		79.8	\	\	17.48	schwache Bande zwischen 20 und 40 bp
113	S. Enteritidis		80.3	\	\	17.75	
114	S. Goldcoast		negativ	negativ	negativ	30.04	Keine Bande
115	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	30.38	
116	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	29.82	
117	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	29.30	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
118	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	28.86	
119	S. Hadar		negativ	negativ	negativ	29.06	
120	S. Indiana		negativ	negativ	negativ	29.33	
121	S. Infantis		\	84	\	18.80	
122	S. Infantis		\	84	\	18.58	
123	S. Infantis		\	84	\	18.47	
124	S. Infantis		\	82.8	\	18.35	
125	S. Infantis		\	81.8	\	17.77	Starke Bande bei ~ 110 bp, schwache Bande bei ~ 50 bp
125	S. Infantis	\$	\	81.8	\	18.57	
126	S. Infantis		\	82.9	\	17.30	
127	S. Infantis		\	83.4	\	18.23	
128	S. Infantis		\	84	\	18.05	
129	S. Infantis		\	84	\	17.99	
130	S. Infantis		\	84	\	18.51	
131	S. Infantis		\	84.5	\	18.37	Starke Bande bei ~ 110 bp, schwache Bande bei ~ 50 bp
132	S. Infantis		\	83.3	\	19.06	
133	S. Infantis		\	82.8	\	17.90	
134	S. Isangi		\	81.8	\	17.50	
135	S. Isangi		\	81.9	\	17.17	
136	S. Isangi		\	82.4	\	18.85	
137	S. Isangi		\	82.4	\	18.17	Starke Bande bei ~ 110 bp
138	S. Kentucky		\	\	80.3	18.91	Keine abgegrenzte Bande
138	S. Kentucky	#	\	\	80.2	18.95	Starke Bande bei ~ 150 bp
139	S. Kottbus		\	81.3	\	22.38	Schwache Bande bei ~ 40 bp, Starke Bande bei ~ 110
140	S. Kottbus		\	81.3	\	17.67	

141	S. Kottbus		\	81.3	\	18.02	
142	S. Kottbus		\	81.8	\	17.88	
143	S. Lexington		negativ	negativ	negativ	28.78	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
144	S. Livingstone		negativ	negativ	negativ	30.05	Schwache Bande bei ~ 50 bp
145	S. Livingstone		negativ	negativ	negativ	30.28	
146	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	30.22	
147	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	29.35	
148	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	29.41	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
149	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	29.09	
150	S. Mbandaka		negativ	negativ	negativ	29.86	
151	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	29.53	
152	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	30.07	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
153	S. Montevideo		negativ	negativ	negativ	29.67	
154	S. Ohio		negativ	negativ	negativ	29.92	
155	S. Ohio		negativ	negativ	negativ	29.41	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
156	S. Ohio		negativ	negativ	negativ	29.11	
157	S. Ohio		negativ	negativ	negativ	29.13	
158	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	28.94	Schwache Bande bei ~ 50 bp
158	S. Rissen	#	negativ	negativ	negativ	29.17	
159	S. Schleissheim		negativ	negativ	negativ	29.71	Schwache Bande bei ~ 50 bp
160	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	28.15	Schwache Banden bei ~ 50 bp und ~ 110 bp
161	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	30.46	Schwache Bande bei ~ 50 bp
162	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	29.99	
163	S. Senftenberg		negativ	negativ	negativ	29.52	
164	S. Enteritidis		79.8	\	\	16.60	
165	S. Enteritidis		79.8	\	\	17.57	
166	S. Enteritidis		80.3	\	\	17.46	
167	S. Enteritidis		80.3	\	\	18.88	Schwache Bande bei ~ 70 bp
167	S. Enteritidis	#	79.1			18.16	Bande bei ~ 80 bp
168	S. Enteritidis		80.4	\	\	17.64	
169	S. Enteritidis		80.9	\	\	17.57	
170	S. Enteritidis		79.3	\	\	18.26	
171	S. Enteritidis		79.3	\	\	17.76	
172	S. Subspezies IIIb		negativ	negativ	negativ	29.63	Schwache Bande bei ~ 50 bp
173	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	29.61	
174	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	29.51	Keine Bande
175	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	29.48	
176	S. Glostrup		negativ	negativ	negativ	31.01	Schwache Bande bei ~ 50 bp
177	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	30.47	
178	S. Typhimurium		78.8	82.2	\	17.96	

179	S. Give		negativ	negativ	negativ	29.89	Sehr schwache Bande bei ~ 50 bp
179	S. Give	#	negativ	negativ	negativ	29.33	
180	S. Dublin		79.2	\	\	20.69	
181	S. Choleraesuis		79	83.3	\	18.82	Banden bei ~ 70 bp und ~ 110 bp
182	S. Rissen		negativ	negativ	negativ	30.81	
183	S. Give		negativ	negativ	negativ	27.27	
184	S. Subspezies IIIb		negativ	negativ	negativ	30.12	
185	S. Subspezies IIIb		negativ	negativ	negativ	30.42	
186	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	27.94	
187	S. Schwarzengrund		negativ	negativ	negativ	27.54	Schwache Bande bei ~ 110 bp
187	S. Schwarzengrund	#	negativ	negativ	negativ	27.70	
188	S. Kentucky		\	\	80.2	18.39	
189	S. Kentucky		\	\	80.7	18.79	Starke Bande bei ~ 150 bp
190	S. Kentucky		\	\	80.8	18.34	
191	S. Kentucky		\	\	81.3	19.91	
192	S. Kentucky		\	\	81.3	18.28	
193	S. Virchow		\	84.8	\	18.29	Starke Bande bei ~ 110 bp
194	S. Virchow		\	82.8	\	17.95	
195	S. Virchow		\	83.2	\	18.47	
196	S. Virchow		\	83.3	\	18.04	
197	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	30.08	
198	S. Tennessee		negativ	negativ	negativ	30.29	
199	S. Typhimurium (Impfstamm)		80	83.8	\	17.65	Banden bei ~ 70 bp und ~ 110 bp
200	S. Enteritidis (Impfstamm)		\	Kleiner Peak (81,8)	\	31.52	Schwache Bande bei ~ 40 bp
200	S. Enteritidis (Impfstamm)	#	\	Kleiner Peak (80,4)	\	29.33	Schwache Bande bei ~ 40 bp
201	S. Typhimurium (Impfstamm)		78.5	82.5	\	18.52	
202	S. Enteritidis (Impfstamm)		79	\	\	19.46	
203	S. Livingstone		negativ	negativ	negativ	30.31	
204	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	30.87	
205	S. Typhimurium		78	82	\	17.80	
206	S. Typhimurium		78	82	\	17.49	
207	S. Enteritidis		negativ	negativ	negativ	29.90	
208	S. Typhimurium (1,4,12:i:-)		negativ	negativ	negativ	29.84	
209	S. Typhimurium (1,4,[5],12:i:-)		negativ	negativ	negativ	29.89	
210	S. Typhimurium		\	82.5	\	18.73	



Anhang 4: Übersichtsschema der Multiplex PCRs nach Rajtak et al. aus dem Jahr 2011 mit der erweiterten Probenauswahl.

X DANKSAGUNG

Allen voran bedanke ich mich bei Frau Dr. Zimmermann. Dafür, dass sie mir zu wirklich jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, selbst zu den turbulentesten Zeiten die einfachsten Fragen immer geduldig und zur Not auch mehrfach erklärt hat und immer das richtige Maß an Anleitung und eigenständigem Arbeiten gefunden hat. Kurzum für die beste Betreuung die man sich als Doktorand nur wünschen kann!

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Straubinger für die schnelle Korrektur dieser Arbeit und insbesondere dafür, dass er auch für einen externen Doktoranden wirklich jederzeit erreichbar war.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Hörmannsdorfer und Herrn Prof. Büttner für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Überlassung dieses Themas.

Ganz besonders bedanke ich mich beim gesamten Team der Veterinärbakteriologie: Ruth Blank, Kirsten Heinbach, Susanne Hünninger, Steffanie Michahelles, Gundula Pfau, Andrea Selzle, Andrea Schuster, Marion Wenzel, Frank Bodenstaff und Cengiz Dedeoglu. Dafür, dass sie immer Zeit und Platz für mich gefunden haben wenn ich eines von beiden benötigt habe und für die nette Atmosphäre bei der man sich jederzeit dazugehörig gefühlt hat.

Ebenfalls großer Dank gebührt meinem Gel-Banden-Kompetenzteam, bestehend aus Susanne Gellert und Schirin Friederichs sowie meiner Stata-Unterstützung Katharina Schneider.

Außerdem bedanke ich mich bei Anna-Lena Rettinger und Mark Kriegbaum für die gute Zeit die wir sowohl innerhalb als auch außerhalb des LGLs hatten.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Lieblingscousine Katharina Gordt für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ganz besonders bei meiner Freundin Katharina Riedl für die Unterstützung und den Rückhalt ohne die die Arbeit vermutlich nie fertig geworden wäre.